Die Präparation der Chlamydomonas-Zygote zur elektronenmikroskopischen Untersuchung ihres Mitochondrieninventars

von
Norbert Brand
aus
Bamberg

Disbui. Erlangen
987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538114_0005

Die Präparation der Chlamydomonas-Zygote zur elektronenmikroskopischen Untersuchung ihres Mitochondrieninventars

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Norbert Brand

aus

Bamberg

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen

Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.1987

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. G. Nollau

Erstberichterstatter: Professor Dr. C.G. Arnold

Zweitberichterstatter: Professor Dr. H. Korn

Forschen ist gar nicht einfach. Man kann Leute wie Wilhelm Conrad Röntgen und Sigmund Freud beneiden, die Ende des vorigen Jahrhunderts die nach ihnen benannten Strahlen, beziehungsweise Psychoanalyse in aller Stille entdeckten.

Heute ist Forschen ein großes Unternehmen geworden. Je kleiner die Teilchen, die erforscht werden, desto größer die Anlagen, mit denen es geschieht. Vielleicht sind die erforschten Teilchen nur deswegen so klein, weil die Maschinen, mit denen sie erforscht werden, so groß sind, oder umgekehrt, oder etwas allgemeiner gesagt: In der Forschung ist das Forschungsresultat Resultat der angewandten Methode. Wenn man Apparate anwendet, die elektronegative oder -positive Teilchen nachweisen, werden elektronegative oder -positive Teilchen nachgewiesen, bis man eines Tages einen Apparat aufstellt, der elektrisch neutrale Teilchen nachweist, dann werden elektrisch neutrale Teilchen nachgewiesen. Das hat noch nie jemand gestört. Alle Elementarteilchen haben sich als nur halb so elementar erwiesen. Die Teilchen sind teilbar geworden. Und wenn es die Teilchen gar nicht gibt? Wenn sie einzig Resultat der angewandten Forschungsmethode wären?

Auch das würde niemand stören...

(Walter Vogt,
Der Wiesbadener Kongress,
Diogenes Verlag, 1972)

Verzeichnis der im Text- und Bildteil verwendeten Abkürzungen

Acr	Acrolein
CL	Collidinpuffer
CO	Cocktail-Fixierung
GA	Glutaraldehyd
GpP	Glykopolypeptide
HE	HEPES-Puffer
KF	Kryofixierung
KS	Kryosubstitution
KF-KS	Kryofixierung mit anschließender Kryosubstitution
MM	Minimal-Medium
NL	Flüssigstickstoff
N-MM	stickstoff-freies Minimal-Medium
OS	Osmiumtetroxid
RT	Raumtemperatur
SCH	Schütteln (als Vorbehandlung für die chemische Fixierun
SP	Sörensen-Phosphatpuffer
Try	Trypsinlösung
UAc	Uranylacetat

Erster Teil

Text, Tabellen, Skizzen, Diagramme

Inhaltsverzeichnis

Erster Teil: Text, Tabellen, Skizzen, Diagramme Seite

1) Einführung in die Problemstellung
1.1) Der Mitochondrienzyklus in Chlamydomonas.....1
1.2) Das Zygotenstadium in Chlamydomonas.....3
1.3) Die Zygotenwand und die methodische Problematik.....4

2) Material und Methoden
2.1) Algenstamm.....7
2.2) Anzucht
2.2.1) Kulturlösungen.....7
2.2.2) Vegetativer Zellzyklus.....8
2.2.3) Gameteninduktion.....8
2.2.4) Kreuzen und Zygotenreifung.....9
2.3) Präparation für die Elektronenmikroskopie
2.3.1) Chemische Fixierung.....10
2.3.2) Kryopräparation
2.3.2.1) Kryofixierung.....14
2.3.2.2) Kryosubstitution.....17
2.4) Serienschnitt-Technik und Elektronenmikroskopie.....22
2.5) Auswertung der Schnittserien
2.5.1) Graphische dreidimensionale Rekonstruktion.....24
2.5.2) Morphometrie.....24
2.5.3) Modellbau.....25

3) Vorbemerkungen und Überlegungen
3.1) Synchronisierung des vegetativen Zellwachstums?.....27
3.2) Art der Zygotenkultivierung?.....27
3.3) Einsatz von Mutanten?.....30

4) Ergebnisse
4.1) Methode
4.1.1) Versuche zur chemischen Fixierung.....31
4.1.1.1) Lange Fixierungszeiten.....31
4.1.1.2) Fixierung nach Vorbehandlung.....32
4.1.1.3) Fixantien mit hohem Penetrationsvermögen.....37
4.1.2) Versuche zur Kryofixierung mit anschließender Kryosubstitution.....39

Seite

4.2) Ergebnisse zu biologischen Fragestellungen.....42
4.2.1) Die Ultrastruktur der reifen Zygote.....43
4.2.1.1) Die Zygotenwand.....43
4.2.1.2) Der Chloroplast.....44
4.2.1.3) Der Zellkern.....45
4.2.1.4) Die Lipidkörper.....46
4.2.1.5) Die Mitochondrien.....47
4.2.2) Auswertung der Schnittserien
4.2.2.1) Die Dimensionen der Zygote.....48
4.2.2.2) Quantitative Daten zum Zellkern.....49
4.2.2.3) Morphometrische Auswertung des Mitochondrieninventars.....50
4.2.2.4) Modellbau.....61
4.2.2.5) Die topographische Verteilung des Mitochondrieninventars.....63

5) Diskussion
5.1) Die Problematik der Mitochondrienfixierung: Allgemein und am Beispiel der Chlamydomonas-Zygote.....68
5.2) Die Unzulänglichkeiten in der chemischen Fixierung der Chlamydomonas-Zygote und deren Ursachen.....70
5.3) Die grundsätzliche Eignung der Kryopräparation zur Darstellung der Mitochondrienstrukturen in ihrem in-vivo Zustand und eine kritische Beurteilung der Methode am Beispiel der Chlamydomonas-Zygote.....75
5.4) Die Ultrastruktur der Mitochondrien in der Chlamydomonas-Zygote nach Gefriersubstitution.....85
5.5) Das Mitochondrienverhalten in der Chlamydomonas-Zygote.....89
5.5.1) Die Chondriommorphologie während des Zygotenzyklus.....90
5.5.2) Die Volumenrelation des Chondrioms in der Zygote.....99
5.5.3) Die topographische Verteilung der Mitochondrien in der Zygote.....100

6) Zusammenfassung.....104

7) Literaturverzeichnis.....107

Zweiter Teil: Anhang mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen.....129-181

1) Einführung in die Problemstellung

1.1) Der Mitochondrienzyklus in Chlamydomonas

Mit Hilfe der Serienschnitt-Technik und nachfolgender dreidimensionaler Rekonstruktion des Mitochondrienbestandes wurde der Mitochondrienzyklus des Phytoflagellaten Chlamydomonas reinhardii bereits umfangreichen quantitativen Untersuchungen unterzogen:

Die ersten Ergebnisse hierzu wurden an in Asynchronkulturen gezogenen Gameten erhalten. Dabei lag die Mitochondrienzahl pro Zelle mit 9 - 14 Organellen bedeutend niedriger, als angesichts der auf Einzelschnitten zahlreich verstreuten Mitochondrienprofile zu erwarten war. Da die meisten Mitochondrien aber keineswegs unkompliziert rundlich gebaut waren, sondern eine langgestreckte zuweilen mehrfach verzweigte Gestalt besaßen, wurde verständlich, daß Organellenanschnitte aus unterschiedlichen Zellregionen Teile ein- und desselben Mitochondriums sein konnten (Arnold et al., 1972; Schötz, 1972; Schötz et al., 1972).

Untersuchungen des hell-dunkel synchronisierten vegetativen Zellzyklus ergaben ständige Veränderungen der numerischen und morphologischen Ausgestaltung des Mitochondrieninventares (Chondriom). Diese Dynamik bezüglich der Mitochondriengestalt wurde als zellstadienspezifisches Verhalten dargestellt:

Die wenigen länglichen und spärlich verzweigten Organelle in jungen Interphasezellen fragmentierten während des Zellwachstums vorübergehend in bis zu 50 einfach gebaute kleine Mitochondrien, bevor sich im letzten Drittel der Wachstumsphase diese kleinen Einheiten zu hochverzweigten Riesenmitochondrien zusammenschlossen. Im Zuge der sich im Dunkel anschließenden Zellteilungsphase zerfiel das Mitochondriennetzwerk wiederum in mehrere kleine wenig verzweigte Einzelorganelle, um sich gleichmäßig auf die Tochterzellen zu verteilen (Osafune et al., 1972a, 1972b, 1975a, 1976; Blank, 1980; Blank et al., 1980).

Bei der Überprüfung des generativen Zellzyklus beobachteten Blank (1980) und Blank et al. (1980), daß nach Dunkel-Kälte Gametogenese die Chondriomcharakteristik des Gameten derjenigen des vegetativen Induktionsstadiums entsprach: Aus jungen Interphasezellen induzierte Gameten besaßen 4 - 9 wenig verzweigte längliche bis ovale Mitochondrien. In Zellen, die dagegen aus der Endphase

UNIV. LEIDEN

des vegetativen Wachstums zu Gameten umgestimmt worden waren, konnten vornehmlich hochverzweigte Mitochondrien angetroffen werden.

Folgerichtig hatten nach Licht-Induktion aus letztgenanntem vegetativem Stadium bereits Grobe und Arnold (1975) und Grobe (1976) in einem Gameten nur ein einziges netzartiges Riesenmitochondrium und in drei weiteren Gameten daneben noch eine unbedeutende Anzahl sehr kleiner Mitochondrienbruchstücke gefunden.

In den bisher untersuchten Phasen des generativen Lebenszyklus zeigt die Chondriomgestalt bei Chlamydomonas dann ebenfalls ein zellstadienspezifisches Verhalten: Die Netzwerke der Gameten dissoziieren in jungen Zygoten sehr schnell in bis zu 50 unkompliziert gebaute Einzelmitochondrien (Grobe, 1976; Grobe und Arnold, 1977).

Die Zellstadienspezifität mit der periodisch wechselnden numerischen und morphologischen Zusammensetzung des Mitochondrieninventars wurde nicht nur in Chlamydomonas angetroffen. Die Befunde an Euglena (Osafune, 1973; Calvayrac et al., 1984; Osafune et al. 1975b, 1975c), Saccharomyces (Stevens, 1974, 1977), Polytoma (Gaffal und Kreutzer, 1977; Gaffal und Schneider, 1980b), Candida (Tanaka et al., 1985) und vermutlich auch Rhodella (Broadwater und Scott, 1986) ergaben übereinstimmend eine Dynamik der Chondriommorphologie in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium: In Chondriomen zur Nicht-Teilungsphase der Zelle, also während des Interphase-Wachstums dominiert ein großes netzförmiges Mitochondrium neben einer geringen Anzahl kleiner Individuen. Beim Eintreten in die Mitose und damit in die Zellteilungsphase, steigt dagegen unter Fragmentierung des Netzes die Zahl der kleinen Einzelmitochondrien stark an.

Andererseits gibt es aber auch Arbeiten, die eine Steuerung der Chondriomgestalt durch den Biorhythmus der Zelle widerlegen sollen. In Saccharomyces (Hoffmann und Avers, 1973), Chlorella (Atkinson et al., 1974) und Euglena (Pellegrini, 1980) wurde zu allen Phasen des Zellzyklus ein einziges netzförmiges Riesenmitochondrium gefunden, während Heywood (1977) in Gyniostonum und Vacuolaria ausschließlich viele einfach gebaute Einzelmitochondrien beschrieb.

Vor diesem Hintergrund sollte die Überprüfung der noch nicht untersuchten Zygotenreifungsperiode die Betrachtung des Mitochondrienzyklus in Chlamydomonas abschließen. Dabei schien es von besonderem Interesse, ob die dynamische Formenvielfalt während des ruhenden zellteilungsfreien Zygotenstadiums ihre Fortsetzung findet.

1.2) Das Zygotenstadium in Chlamydomonas

Nach der durch Stickstoff-Entzug ausgelösten Differenzierung der haploiden vegetativen Zellen zu sexuell aktiven Gameten mündet mit der Verschmelzung der Gameten unterschiedlichen Paarungstyps der Chlamydomonas-Zyklus in das diploide Zygotenstadium. Dieses ist gekennzeichnet durch drei Abschnitte (Levine und Ebersold, 1960; Van Winkle-Swift und Burrascano, 1983): Die Differenzierungsphase während der ersten 24 Stunden der Zygotenentwicklung, die Phase der Reifung und Ruhe, die im Labor nach sechs Tagen abgeschlossen ist, und schließlich die Auskeimungsphase, die bei geeigneten äußeren Bedingungen mit dem Durchlaufen der Meiose beginnt und der Freisetzung der Tochtergeneration dient.

Während der Differenzierungsphase finden in der jungen Zygote spezifische Veränderungen statt. Mit einer beachtlichen Syntheseleistung bildet die Zelle Proteine und Glykoproteine. Diese besitzen ein zygotenspezifisches, von dem der haploiden Zyklusphase abweichendes Muster. Sie dienen überwiegend dem Aufbau der mächtigen Zygotenwand (Minami und Goodenough, 1978; Catt, 1979). In vermehrtem Maße synthetisiert die junge Zygote auch Reservestoffe, die in Form von Stärkegranula und Lipidkörpern im Cytoplasma gespeichert werden (Cavalier-Smith, 1976). In etwa zeitgleich während der zweiten und dritten Stunde nach dem Kreuzen fusionieren die elterlichen Zellkerne (Cavalier-Smith, 1976; Minami und Goodenough, 1978) und Plastiden (Cavalier-Smith, 1970; Blank et al., 1978). Zum Mitochondrienverhalten in der Chlamydomonas-Zygote ist bis jetzt nur bekannt, daß die Organellennetzwerke der beiden Gameten sehr schnell zerfallen. In einer sieben Stunden alten Zygote waren ungefähr 50 Einzelmitochondrien von überwiegend rundlicher Gestalt anzutreffen (Grobe, 1976; Grobe und Arnold, 1977). Eine Fusion der beiden Gameten-Netze unmittelbar nach dem Kreuzen, die von Gaffal und Schneider (1978) für den nahe verwandten Flagellaten Polytoma nachgewiesen wurde, ist auch für Chlamydomonas wahrscheinlich. Eine spätere Wiedervereinigung der vielen Einzel-

mitochondrien zu größeren Aggregaten in der älteren Zygote ist ebenfalls denkbar. Beides wurde aber elektronenmikroskopisch noch nicht überprüft. Der Nachweis solcher Fusionsvorgänge der Mitochondrien in Analogie zu Zellkern und Plastide wäre aber aus folgendem Grunde von Bedeutung:

Bekanntlich enthält nicht nur der Zellkern DNA, sondern auch die Plastide (Sager und Ishida, 1963) und die Mitochondrien (Ryan et al., 1978). Demnach sind diese Strukturen Trägerorganelle der Erbinformation. Die oben erwähnten Kern- und Plastidenfusionen bilden die Basis für die Kontaktaufnahme sowohl der nukleären als auch der plastidären Gene. Sie stellen für den Fall der Vermischung väterlicher und mütterlicher DNA die strukturelle Voraussetzung für die sexuelle Rekombination des nukleären und plastidenlokalisierten extranukleären Erbgutes dar.

Gelänge es demnach, in der Chlamydomonas-Zygote auch Fusionen der Mitochondrien aufzuzeigen, so könnte damit ein Beitrag zu den strukturellen Voraussetzungen für eine sexuelle Rekombination der mitochondriengebundenen extranukleären Erbinformation geleistet werden. Diesem Zweck dienende Mitochondrienfusionen sind natürlich auch während des vegetativen Zyklus möglich.

Die biologische Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand folglich darin, die eingangs geschilderten Untersuchungen des Mitochondrienzyklus von Chlamydomonas mit den Ergebnissen der noch nicht analysierten Lebensstadien zu ergänzen. Hierbei sollte besonders darauf geachtet werden, ob sich die Mitochondrienmorphodynamik fortsetzt und ob durch Mitochondrienfusionen die Möglichkeit für eine Kontaktaufnahme der mitochondrialen Genome bereits in der Zygote geschaffen wird.

1.3) Die Zygotenwand und die methodische Problematik

Einer zufriedenstellenden elektronenmikroskopischen Präparation von Zygoten, die älter als sieben Stunden sind, stand bis jetzt die derbe Zygotenwand im Wege (Grobe, 1976; Grobe und Arnold, 1977). Nach der Kernfusion setzt die Sezernierung von Wandmaterial ein und am Ende der 24-stündigen Differenzierungsphase ist die Zygotenwand voll ausgebildet (Minami und Goodenough, 1978). Sie hat eine wichtige Funktion im Chlamydomonas-Lebenszyklus:

Als potentiell langlebiges zellteilungsfreies Stadium dient die Zygote nicht nur der sexuellen Rekombination. Sie sichert in der

Natur auch den Fortbestand der Art, wenn ungünstige lebensbedrohende Umstände, wie z.B. Trockenheit oder Kälte, eintreten. Dank einer sehr undurchlässigen Zellwand ist das Zygoteninnere wirkungsvoll von der Umgebung abgeschirmt. Die Zellen sind dadurch in der Lage, widrige äußere Bedingungen zu tolerieren, die für das vegetative Stadium sofort tödlich wären (Sager und Granick, 1954; Van Winkle-Swift und Burrascano, 1983).

Einige Beispiele sollen die Barrierefunktion der Zygotenwand veranschaulichen. Lewin (1952) stellte fest, daß reife Zygoten Aceton- und Chloroformdämpfen, denen sie kurzzeitig ausgesetzt waren, widerstanden. Auch cytologische Fixantien, verschiedene Alkohole und verdünnte Säuren töteten nur wenige Zygoten ab (Lewin, 1957). Viele Zygoten, die eine Woche lang in Aceton oder fünf Jahre (!) in trockener Raumluft belassen worden waren, keimten noch aus (Lewin, 1957). Absolutes Ethanol konnte reifen Zygoten ebenfalls nichts anhaben (Cavalier-Smith, 1976).

Folgerichtig muß mit beträchtlichen Schwierigkeiten bei der chemischen Fixierung als Voraussetzung für elektronenmikroskopische Untersuchungen älterer Zygoten gerechnet werden. Dies bestätigt auch ein Blick in die Literatur, der nur wenige Arbeiten liefert, die Angaben zur Ultrastruktur der reifen Chlamydomonas-Zygote machen (Brown et al., 1968; Cavalier-Smith, 1976; Triemer und Brown, 1976; Minami und Goodenough, 1978). Das Interesse der Einzelschnitt-Untersuchungen dieser Autoren galt aber nicht den Mitochondrien. Ein eigenes Nachvollziehen ihrer Fixierungsvorschriften ergab eine Strukturerhaltung, die sich als unbrauchbar erwies, um Mitochondrienanschnitte für Serienschnitt-Untersuchungen eindeutig identifizieren und vertrauenswürdig morphometrisch auswerten zu können.

Wünschenswertes Ziel einer elektronenmikroskopischen Präparation sollte es eigentlich sein, die Probe ohne strukturelle Veränderungen in ihrem nativen Zustand zu fixieren, und daraufhin auch diese native Struktur abzubilden. Im Verlauf dieser Arbeit wird näher darauf eingegangen werden, daß Artefakte unvermeidbar sind und gerade die sehr empfindlichen Mitochondrienstrukturen hohe Anforderungen an die Präparationsmethode stellen, will man sie in möglichst lebensnah stabilisiertem Zustand untersuchen. Es darf keineswegs genügen, Mitochondrien nur in irgendeiner Weise sichtbar zu machen. Hier sei an die Kaliumpermanganat-Fixierung erinnert, die membranbegrenzte Strukturen zwar in hervorragendem, die

Auswertungsarbeiten erleichterndem Kontrast zur Abbildung bringt, aber dieser Kontrast ist lediglich Ergebnis einer übermäßigen Extraktion cytoplasmatischer Bestandteile (Hayat, 1970). Die nach Einsatz dieses drastischen Fixans erhältliche elektronenmikroskopische Information gibt folglich nur noch wenig vom in-vivo Zustand der Zelle wieder. Auch wenn sich die Befunde zur Mitochondrienzahl in vegetativen Chlamydomonas-Zellen nach Glutaraldehyd-Fixierung (Blank, 1980; Blank et al., 1980) und nach Kaliumpermanganat-Fixierung (Osafune et al., 1972a, 1972b, 1975a, 1976) teilweise decken, ist doch nicht zu übersehen, daß die Ultrastruktur der mit Kaliumpermanganat stabilisierten Mitochondrien durch Verlust der Organellenmatrix sowie durch Aufblähung der Mitochondrienkonturen artefiziell schwer geschädigt ist. Gerade letzteres würde aber die morphometrischen Bestimmungen an Mitochondrien verfälschen.

Die methodische Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand also in der Suche nach einer Präparationsmethode, die in der schwer fixierbaren Chlamydomonas-Zygote die labilen Mitochondrienstrukturen möglichst lebensecht darstellt, um damit glaubwürdige und aussagekräftige Befunde zu erhalten.

Als erstes Untersuchungsstadium wurde die reife sechs Tage alte Zygote gewählt. Sie dürfte am schwierigsten zu fixieren sein, doch müßte die an ihr erprobte Präparationsmethode auch an jüngeren Zygoten erfolgreich angewendet werden können.

Im Verlauf dieses ersten rein methodischen Abschnittes der vorliegenden Arbeit sollte es sich nach Ausschöpfung aller sinnvoll erscheinenden Möglichkeiten der konventionellen chemischen Fixierung als notwendig erweisen, eine für Algenzellen neuartige Präparationstechnik einzuführen, um die biologische Fragestellung in der gewünschten Präzision bearbeiten zu können.

2) Material und Methoden

2.1) Algenstamm

Der Süßwasserphytoflagellat Chlamydomonas reinhardii aus der Klasse der Chlorophyceae, Ordnung Volvocales, Familie Chlamydomonadaceae, wird in unserem Labor in Dauerkultur gehalten. Der Stamm 137c des Wildtyps mit den beiden Paarungstypen mt(+) und mt(-) diente für die hier beschriebenen Untersuchungen als biologisches Material. Dieser Stamm, der als Stickstoffquelle nur Ammonium-, nicht aber Nitratsalze verwerten kann, wurde erstmals von Loppes (Lüttich) erhalten.

2.2) Anzucht

Es sollte die reife Chlamydomonas-Zygote untersucht werden. Um diese zu erhalten, müssen der vegetative und der generative Zellzyklus durchlaufen werden, wobei sich bei Letzterem die Kultivierung nur von der Gameteninduktion über das Kreuzen der Gameten bis zur Zygotenreifung erstreckt.

2.2.1) Kulturlösungen

Zur Anzucht der vegetativen Zellen wurde ein Minimalmedium (MM) eingesetzt, welches weitestgehend den Angaben von Loppes (1966, 1969) entsprach. Es hatte folgende Zusammensetzung:

NH_4Cl	0,40 g	(7,48 mmol)
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,35 g	(1,42 mmol)
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,05 g	(0,34 mmol)
KH_2PO_4	0,36 g	(2,64 mmol)
K_2HPO_4	0,72 g	(4,13 mmol)
Spurenelementlösung	1,00 ml	
aqua dest.	1000 ml	

Die Rezeptur für die Spurenelementlösung ist bei Hutner et al. (1950) beschrieben.

Zur Gameteninduktion, zum Kreuzen und zur Zygotenreifung wurde ein stickstoff-freies MM (N-MM) verwendet. Das N-MM entspricht genau obigem MM, wobei die Stickstoffquelle NH_4Cl weggelassen wird.

Als Puffer diente ein Phosphatpuffer folgender Zusammensetzung:

KH_2PO_4	7,26 g	(53,0 mmol)
K_2HPO_4	14,34 g	(80,0 mmol)
aqua dest.	1000 ml	

Zum Waschen und Resuspendieren von Zellen wurde jeweils ein

Teil dieses Puffers mit zwei Teilen aqua dest. verdünnt.

Alle o.a. Substanzen stammen von der Firma Merck (Darmstadt).

Zur Zellkultivierung auf Platten wurde das MM durch Zusatz von 1% (G/V) Bacto-Agar (Difco-Laboratories, Detroit) verfestigt.

Die Sterilisation aller Kulturlösungen erfolgte durch 30-minütiges Autoklavieren bei 120°C und ca. 2 bar.

2.2.2) Vegetativer Zellzyklus

Zur Anzucht der Zellen während des vegetativen Zellzyklus wurden von beiden Paarungstypen Zellen aus den in Schrägagarröhrchen bei 14°C gehaltenen Dauerkulturen entnommen, auf MM dünn ausplattiert und etwa drei Tage lang bei 24°C im Dauerlicht (17 klx) anwachsen lassen.

Von dem während dieser Zeit gebildeten Algenrasen wurden die beiden Wildtypen mt(+) und mt(-) mit einer ausgeglühten Platinöse in jeweils 250,0 ml MM übergeimpft. Die Anzuchtkolben wurden in Lichtringe (Radium, NL 32W/30C, Warmton) gestellt und im Dauerlicht (ca. 15 klx) bei 24°C gehalten. Begast wurden die Kulturen mit durch Watte filtrierter Luft. Nach drei Tagen war das Inokulum zu einer kräftig-grünen Zellsuspension herangewachsen. Die Zellzahl wurde nicht bestimmt.

2.2.3) Gameteninduktion

Unabdingbare Voraussetzung für den Eintritt in den generativen Zellzyklus ist die Abwesenheit von Stickstoff im Medium (Sager und Granick, 1954), hierdurch werden die vegetativen Zellen zur Gametogenese umgestimmt.
Die beiden vegetativen Zellkulturen wurden bei 6000 U/min abzentrifugiert (Varifuge; Heraeus-Crist, Osterode), zweimal mit verdünntem Phosphatpuffer gewaschen, um allen Stickstoff zu entfernen, und schließlich in N-MM inokuliert. Die Kulturbedingungen hinsichtlich Licht, Temperatur und Begasung entsprachen denen der vegetativen Anzuchtperiode.

Hell-Dunkel synchronisierte vegetative Zellen sind nach 15 Stunden Stickstoffmangel vollständig zu Gameten differenziert (Kates und Jones, 1964). Den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten asynchronen Dauerlichtkulturen wurden dagegen 20-24 Stunden zur

Gametogenese gewährt (van Winkle-Swift, 1977), da hier mit einer uneinheitlichen und teilweise verzögerten Umwandlung in Gameten gerechnet werden mußte.

2.2.4) Kreuzen und Zygotenreifung

Zum Kreuzen der nun kopulationsbereiten Gameten müssen ungefähr gleiche Mengen der beiden Kreuzungspartner vermischt werden. Hierzu werden die beiden Gametenkulturen abzentrifugiert und getrennt in frischem N-MM aufgenommen. Die mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und nach folgender Gleichung

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl Zellen} \times 1{,}6 \times 10^5}{\text{Anzahl ausgezählter Planquadrate}}$$

ermittelten unterschiedlichen Gametenzahlen in beiden Kulturen konnten sodann mit verdünntem Phosphatpuffer auf die gleiche Zelldichte eingestellt werden. Nun wurden gleiche Volumina der beiden Gametensuspensionen in einem 1-Liter Becherglas miteinander vermischt, zunächst 24 Stunden ohne Begasung am Licht belassen, und anschließend fünf Tage ins Dunkle gestellt.

Der Kreuzungsvorgang mit anfänglicher Paarbildung und anschließender Fusion der beiden Gameten zur Zygote ist nach 30 Minuten überwiegend abgeschlossen (Sager und Granick, 1954). Die jungen Zygoten in Flüssigkultur reichern sich an der Oberfläche des Mediums an und bilden dort die von Sager (1955) beschriebene Zygotenhaut. Diese wird bereits wenige Stunden nach dem Mischen der Gameten makroskopisch sichtbar und es handelt sich dabei um ein klebriges robustes Pseudo-Gewebe aus unterschiedlich dicht gepackten Zygoten. Als Matrix, welche die einzelnen Zygoten fest zusammenkittet, dient fibrilläres Zellwandmaterial (Cavalier-Smith, 1976).

Bei späteren Versuchen sollte es von besonderer Wichtigkeit sein, möglichst dünne Zygotenhäutchen zu erhalten. Dies wurde zum einen erreicht durch eine nicht zu hohe Zelldichte in den beiden Gametenkulturen. Meist betrug diese 10^6 Gameten/ml vor dem Kreuzen. Zum anderen dienten als Kulturgefäße während der Zygotenreifungsperiode Bechergläser mit großem Durchmesser, in denen sich die Zygoten an einer großen Oberfläche in möglichst geringer Schichtdicke anreichern konnten.

Bei einigen anderen Versuchen sollte durch Schütteln der Kreuzungssuspension die Zusammenlagerung der Zygoten verhindert

werden. Hierzu wurde das Kulturgefäß 15 Minuten nach dem Mischen der Gameten auf eine Schüttelmaschine gestellt (G 24 Environmental Shaker, New Brunswick Scientific Co.) und während der 24 Stunden im Licht und des ersten Tages der Dunkelperiode kontinuierlich bei 190 U/min geschüttelt. Danach wurde die hiermit erhaltene grobe Zygotensuspension abzentrifugiert, in frisches N-MM übertragen und wiederum für die restlichen vier Tage ins Dunkle gestellt. Da auch jetzt noch eine starke Tendenz zur Zellzusammenlagerung festzustellen war, wurde die Suspension mit einer fein ausgezogenen Pasteurpipette zweimal täglich gut durchpipettiert.

Nach einem Tag im Licht und fünf Tagen im Dunklen sind die Zygoten voll ausgereift (Levine und Ebersold, 1960), sie würden beim Übertragen ins Licht und in stickstoffhaltiges MM die Meiose durchführen und anschließend auskeimen. Es wurden auch schon kürzere Reifungsperioden und andere Reifungsbedingungen erprobt und für ausreichend erachtet (van Winkle-Swift, 1977), doch wurde in der vorliegenden Arbeit an der klassischen Laborvorschrift festgehalten.

Die auf diese Weise durchgeführte Zygotenanzucht lieferte problemlos und in hoher Ausbeute reife Zygoten in Form eines dunkelgrünen, stabilen Häutchens. Auf eine Bestimmung der Kreuzungsrate wurde verzichtet.

2.3) Präparation für die Elektronenmikroskopie

Um die geeignete Fixierungsmethode zu finden, wurde das biologische Objekt nach zwei verschiedenen Präparationsmethoden bearbeitet: Zunächst kam die konventionelle chemische Fixierung zur Anwendung, dann wurde die noch nicht zu den Routinemethoden zählende Kryopräparation in unserem Arbeitskreis neu eingeführt.

2.3.1) Chemische Fixierung

Zur Durchführung der hier beschriebenen Fixierungsschemata wurden insgesamt folgende Präparationsmittel benötigt:

Collidinpuffer 50 mmol, pH 7,5

Die Herstellung dieses Puffers ist ausführlich bei Blank (1980) beschrieben.

HEPES-Puffer 10 mmol, pH 7,2

283,3 mg 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino)-ethansulfonsäure

(HEPES, EGA-Chemie, Steinsheim) werden in 100,0 ml aqua dest. gelöst und mit einigen Tropfen 1N-Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt.

Sörensen-Phosphatpuffer 50 mmol, pH 7,5
340,3 mg KH_2PO_4 und 445,0 mg $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ (beide Substanzen von Merck, Darmstadt) werden in 100,0 ml aqua dest. gelöst und mit 1N-Natronlauge tropfenweise auf pH 7,5 gebracht.

Trypsin-Lösung 0,3%, pH 7,8 (Triemer und Brown, 1976)
60,0 mg Trypsin (Type III-S, aus Rinderpankreas, Sigma, Taufkirchen) werden in 20,0 ml N-MM gelöst und mit 1N-Natronlauge auf pH 7,8 eingestellt. Neben dieser Konzentration wurde in einer Versuchsreihe auch eine entsprechend hergestellte 0,4%-ige Trypsinlösung eingesetzt.

Osmiumtetroxid-Stammlösung 4%
200,o mg kristallines OsO_4 (OS, Ampullenform, Merck, Darmstadt) werden in einer sorgfältig gereinigten Braunglasflasche mit 5,0 ml aqua bidest. versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Nach zwei Tagen hat sich das Reagens vollständig gelöst. Diese Stammlösung wird durch Verdünnen mit dem entsprechenden Puffer kurz vor Fixierungsbeginn auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Glutaraldehyd-Lösung (GA)
Dieses Fixans ist u.a. als 25%-ige stabilisierte Lösung im Handel (Serva, Heidelberg). Durch Verdünnen mit Puffer wird die angestrebte Konzentration hergestellt.

Cocktail-Fixans
Dieses Fixantiengemisch aus GA und OS wurde in der vorliegenden Arbeit in zwei Mischungsverhältnissen eingesetzt: GA 2% / OS 2% und GA 1% / OS 2%. Ersteres wurde erhalten durch das Zusammengießen gleicher Volumina jeweils 4%-iger Lösungen von GA und OS. Bei der Herstellung der zweiten Mischung wurden eine 2%-ige GA-Lösung und eine 4%-ige OS-Lösung im Verhältnis 1:1 vereint. Es war wichtig, daß die beiden eisgekühlten Ausgangslösungen erst unmittelbar vor der Fixierung gemischt wurden.

Kaliumpermanganat 2% (Osafune et al., 1972a)
Als Lösungsmedium für dieses Fixans diente das entsprechende Volumen N-MM.

Acrolein
Dieser bei Raumtemperatur flüssige, ungesättigte Aldehyd polymerisiert leicht und ist deshalb mit 0,1% Hydrochinon als Stabilisator versetzt im Handel (Serva, Heidelberg). Acrolein ist leicht entflammbar und stark flüchtig. Seine Dämpfe stellen ein giftiges Reizgas dar. Alle Arbeiten mit Acrolein müssen in einem gut ziehenden Abzug durchgeführt werden (Albin, 1962). In der vorliegenden Arbeit diente ausschließlich der Sörensen-Phosphatpuffer als Vehikel für dieses Fixans. Es wurde entweder in 5%-iger Konzentration, oder in einer Mischung aus 2% Acrolein und 5% GA eingesetzt.

Gerbsäure
Aufgrund der Interaktionen dieser Säure mit verschiedenen Puffern wurde sie als 2%-ige Lösung in aqua bidest. verwendet und manchmal als Drittfixans der Aldehyd- und Osmiumfixierung nachgeschaltet.

Die Zygotenprobe wurde entweder direkt in Form des unzerkleinerten Häutchens fixiert, oder erst einer Vorbehandlung unterworfen, die die nachfolgenden Fixierungsschritte erleichtern sollte. Die eine Vorbehandlung bestand in dem Versuch der Zellwandlyse mit Trypsin. Hierbei wurden Zygotenhautstückchen aus ihrem N-MM entnommen und in die vorbereitete Trypsinlösung übertragen. Durch Variieren der Enzymkonzentration, der Einwirkungsdauer und der Reaktionstemperatur wurden verschiedene Bedingungen für die Trypsinvorbehandlung getestet (Tab.1, S.13). Nach der jeweiligen Behandlung wurde das Häutchen zur sofortigen Inaktivierung des Trypsins in eiskaltes N-MM gebracht, dem wenige Tropfen 2%-ige GA-Lösung zugesetzt waren. Mit diesem Medium wurde die Probe dreimal im schnellen Wechsel gewaschen, um das Trypsin vollständig zu entfernen. Die so vorbehandelten Zygoten konnten nun fixiert werden.

Die andere Vorbehandlung des 48-stündigen Schüttelns der Kreuzungssuspension zur Störung der Zygotenzusammenlagerung und der Zygotenwandbildung wurde bereits auf Seite 9-10 beschrieben. Die dabei anfallende grobe Zellsuspension wurde entweder gleich fixiert, oder zusätzlich noch der oben geschilderten Enzymbehandlung unterzogen, und danach fixiert.

	Vorbehandlung	1.Fixans	2.Fixans	Puffer
		GA 2/24	OS 1/4	HE
1)		GA 2/12	OS 1/4	HE
		GA 2/24	OS 1/4 (*)	HE
	TryO,3/1;2;5/RT	GA 2/1	OS 2/1	CL
	TryO,3/1;2;5/RT	GA 2/1	OS 2/1	CL
	TryO,3/1;2;5/RT	GA 2/2	OS 2/2	CL
	TryO,3/2;5/RT	GA 4/2	OS 2/2	CL
	TryO,3/1/RT	GA 2/2	KMn 2/1	CL/N-MM
	TryO,3/1;3/RT	CO 2:2/2	OS 2/2	CL
2)	TryO,4/1;2/RT	GA 2/2	OS 2/2	CL
	TryO,4/1;2/RT	CO 1:2/2	OS 2/2	CL
	TryO,4/1;2/RT	CO 2:2/2	OS 2/2	CL
	TryO,3/2;3;4/37	GA 2/2	OS 2/2	CL
	TryO,3/2;3;4/37	GA 2/2	OS 2/2	HE
	TryO,3/2;3;4/37	CO 2:2/2	OS 2/2	HE
3)	SCH	GA 2/2	OS 2/2	HE
	SCH	GA 2/12	OS 2/2	HE
	SCH + TryO,3/2;3;5;15/37	GA 2/2	OS 2/2	HE
4)	SCH + TryO,3/2;3/37	CO 1:2/2	OS 2/2	HE
	SCH + TryO,3/2;3;5/37	CO 2:2/2	OS 2/2	HE
	SCH + TryO,3/2;3;5/37	CO 2:2/2	OS 2/2 (*)	HE
		ACR 5/2	OS 2/2	SP
	TryO,3/2;5/37	ACR 5/2	OS 2/2	SP
		ACR 2 / GA 5 /2	OS 2/2	SP
5)	TryO,3/2;5/37	ACR 2 / GA 5 /2	OS 2/2	SP
	SCH	ACR 5/2	OS 2/2	SP
	SCH + TryO,3/2;5/37	ACR 5/2	OS 2/2	SP
	SCH + TryO,3/2;5/37	ACR 2 / GA 5 /2	OS 2/2	SP

Tabelle 1: Übersicht zu den meisten der ausgeführten chemischen Fixierungen; Abkürzungen siehe gesondertes Verzeichnis;
Legende: TryO,3/2;3;5/37 heißt, es wurde mit einer 0,3%-igen Trypsinlösung jeweils zwei, drei und fünf Minuten lang bei 37°C vorbehandelt;
CO 1:2/2 heißt Cocktailfixierung mit einer Mischung aus 1% GA und 2% OS zwei Stunden lang;
GA 2/2 heißt Fixierung mit 2% GA zwei Stunden lang;
(*) bedeutet Drittfixierung mit 2% Gerbsäure eine Stunde lang;

Alle Präparationsschritte wurden im Eisbad bei 4°C durchgeführt. Nach jedem Aufenthalt in einer Fixierlösung wurden die Zellen jeweils 3x15 Minuten im Puffer gewaschen. Lediglich bei der Präparation der Schüttelkulturen wurde das biologische Material zwischen den einzelnen Arbeitsschritten abzentrifugiert, (Crist-Zentrifuge, 4000 U/min, eine Minute lang), beim Präparieren des Häutchens dagegen genügte einfaches Dekantieren zur Abtrennung der Probe von der jeweiligen Lösung.

Die so aufbereiteten Zygoten wurden dann in eine 1:1-Mischung aus Propylenoxid und frisch zubereitetem Spurr-Einbettungsmittel mittleren Härtegrades (Spurr, 1969) übertragen, eine Stunde im verschlossenen und schließlich mindestens acht Stunden in offenen Zentrifugenröhrchen belassen. Währenddessen wurden sie langsam in Schräglage gedreht (Heavy Duty Rotator, Bachofer, Reutlingen). Da Propylenoxid bei Raumtemperatur flüchtig ist, wurde mit dieser Anordnung erreicht, daß der Transfer der Zellen in reines Spurr-Gemisch stufenlos vonstatten ging, wobei durch die kontinuierliche Drehbewegung die Proben stets allseitig vom Medium umspült wurden.

Nach zweimaligem Wechseln des reinen Einbettungsmittels wurde das biologische Material in Gelatinekapseln (Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt) eingebracht. Mindestens acht Stunden im Trockenschrank bei 60°C waren erforderlich, um den Kapselinhalt zu festen Blöcken auszuhärten.

2.3.2) Kryopräparation

Diese Arbeitstechnik mußte von Grund auf neu eingeführt werden, weswegen ihre Handhabung ausführlicher dargestellt werden soll. Die hier angewandte Präparation gliederte sich auf in die Kryofixierung, dem schockartigen Einfrieren des Objekts, und die Kryosubstitution, der Tieftemperaturentwässerung unter Zusatz chemischer Fixantien.

2.3.2.1) Kryofixierung

Von den unterschiedlichen inzwischen beschriebenen Varianten des Einfrierens (Übersicht bei Plattner und Bachmann, 1982) wurde in der vorliegenden Arbeit die Immersionskryofixation eingesetzt. Es handelt sich dabei um das schnelle Einfrieren eines Objektes durch Eintauchen in ein flüssiges Kühlmittel (Kryogen). Ausgeführt werden kann die Immersion zum einen mit selbstgebau-

ten, je nach Fragestellung mehr oder weniger komplizierten Apparaturen (z.B. Heuser et al., 1979; Costello und Corless, 1978; Völcker et al., 1984). Zum anderen sind inzwischen relativ teure, auf den Vorstellungen von Sitte et al. (1977) basierende Geräte serienmäßig erhältlich. Mit einfachen Mitteln konnte deren Prinzip nachvollzogen werden, wobei folgende Materialien benötigt wurden:

- # ein Magnetrührer IKA-Mag RCT (Ika-Werk , Staufen)
- # eine Styropor-Box 13x13x10 cm mit Styropor-Deckel
- # ein Digitalthermometer technoterm^{R} 9400 (Testoterm KG, Lenzkirch)
- # ein Messingzylinder (innerer Ø 2,5 cm, Höhe 7 cm) beschickt mit einem kleinen Rührmagneten
- # eine Stahlscheibe (Ø 4,5 cm, Stärke 1,5 cm) mit mehreren konischen Bohrungen (Ø 1 cm) und aufschraubbarem Deckel
- # goldene Sandwich-Trägernetzchen Gilder Grids 3,05 mm, GD50 / 50Au (Hert Mikrotechnik, München)
- # ein Stativ mit mehreren Klammern und Muffen
- # Flüssigstickstoff (NL, -195,8°C) als Kältebad
- # Propangasflasche mit Reduzierventil (TEGA, Nürnberg) zur Erzeugung des Kryogens
- # selbstgebaute Einfrierapparatur (Abb.1), bestehend aus einem ausgebohrten Messingrohr (äußerer Ø 5 mm, innerer Ø 4 mm, Länge 29 cm), welches als Führungsrohr dient für eine massive Messingstange (Ø 3,5 mm, Länge 49 cm); am Stativ befestigt wird die ganze Vorrichtung mit einem im rechten Winkel an das Führungsrohr angelöteten Verbindungsrohr, das von der Stativmuffe gegriffen wird.

In Arbeitsstellung wird das Führungsrohr vertikal ausgerichtet, so daß die darin eng anliegende Messingstange leicht senkrecht auf und ab bewegt werden kann. Am unteren Ende der Messingstange wird über einen Adapter eine Tuschefeder aufgesteckt, die dazu dient, zwischen ihren spitzen Enden das Trägernetzchen mit dem Objekt pinzettenartig festzuhalten (Abb.2). Unweit des oberen Endes der Messingstange ist eine Schlauchklemme fest angeschraubt (Abb.3) , die die Abwärtsbewegung der Messingstange beim Aufprallen auf das Führungsrohr stets an dem selben Punkt stoppt (Abb.4). Durch Lockern der Stativmuffe kann die Apparatur seitlich ausgeschwenkt werden,

um sie mit einer neuen Probe zu beschicken.

Zum Einfrieren sind folgende Handgriffe erforderlich: Die Styropor-Box wird auf den Magnetrührer gestellt und in ihr der Messingzylinder mit dem kleinen Rührmagneten genau über dem Rührwerk plaziert. Die Stahlscheibe zum Aufnehmen der eingefrorenen Proben findet daneben noch Platz. Die Styropor-Box wird etwa zur Hälfte mit NL befüllt. Die Erzeugung von Flüssigpropan als Einfriermittel erfolgt durch Kondensation von Propangas:

In einer mit NL gefüllten Thermoskanne befindet sich ein mehrfach spiralig zurechtgebogenes Kupferröhrchen, dessen eines Ende an die Propangasflasche angeschlossen ist und dessen anderes Ende etwa 10 cm aus der Thermoskanne herausragt. Wird Propangas unter leichtem Überdruck derart durch NL geleitet, dann kühlt es so stark ab, daß es sich verflüssigt und am Ende der Rohrleitung heraustropft. Nach dem Verwerfen des Vorlaufs wird das Flüssigpropan in den Messingzylinder dirigiert und dieser unter Rühren bis zum Rand gefüllt. Sodann wird die Styroporbox mit NL so weit befüllt, daß der Messingzylinder eben noch aus der NL-Oberfläche herausragt. Aufgrund dieser innigen Kühlung betrug die Temperatur des Flüssigpropans, und damit die Einfriertemperatur, stets etwa -191°C. Sie lag also unterhalb des Gefrierpunkts von Propan (-189°C), dessen Verfestigung aber durch das Rühren verhindert werden konnte.

Nachdem die an dem Stativ fixierte Einfrierapparatur genau über dem Kryogenbehältnis zentriert ist, wird das Kältebad abgedeckt. Das Abdecken soll die Kondensation von Luftsauerstoff an der Propanoberfläche verhindern, was zu hochexplosiven Propan-Sauerstoff-Gemischen führen würde.

Zum Einfrieren werden möglichst dünn kultivierte Zygotenhäute in einer Petrischale unter N-MM auseinandergespreitet. Kleine Hautstückchen von ungefähr 1 mm^2 werden zurechtpräpariert und jedes auf ein Trägernetzchen unter Vermeidung von Faltenbildung aufgenommen. Die Trägernetzchen sind bereits an Tuschefedern befestigt. Überschüssiges Medium wird mit Filterpapier vorsichtig abgesaugt, dann wird das Präparat an der Luft trocknen lassen. Die Tuschefeder mit dem eben trockenen Objekt wird an das untere Ende der vertikal ausgerichteten Messingstange aufgesteckt

und direkt an das abgedeckte Kältebad herangefahren. Nun wird mit der einen Hand der Deckel abgenommen und mit der anderen Hand die Messingstange, gelenkt durch das Führungsrohr, energisch, aber doch mit Gefühl, bis zum Anschlag nach unten gedrückt. Durch die am oberen Ende der Messingstange angeschraubte Schlauchklemme wird die Eintauchtiefe des Objekts in das Kryogen mit etwa 3 cm reproduzierbar festgelegt. Das Rühren verhindert die Ausbildung eines Temperaturgradienten im Propan, so daß das Objekt auf seinem Tauchweg stets auf frisches Kryogen trifft.

Dieser einfache Handbetrieb ermöglichte problemlos Eintauchgeschwindigkeiten von 4 m/sec (Kriz, 1985), welche nach Costello et al. (1984) in dem Bereich zur Erzielung optimaler Abkühlraten liegen.

Nach ungefähr fünf Sekunden wird das eingefrorene Präparat aus dem Propan herausgezogen und durch Verschieben des Führungsrohres und anschließendes Absenken in das Stickstoffbad über eine der Bohrungen der Stahlscheibe gebracht. Mit einer mit Teflonband isolierten und vorgekühlten Pinzette wird das Netzgrid samt dem daran haftenden gefrorenen Häutchen unter NL vorsichtig von der Tuschefeder gelöst und in die Bohrung fallen lassen. Durch dieses Vorgehen hat das eingefrorene Präparat zu keinem Zeitpunkt die kalte Gasatmosphäre von ca. -170°C innerhalb der Styropor-Box verlassen, die mit dem am Stativ befestigten Digital-Thermometer laufend überwacht wird.

Nachdem auf diese Weise zehn bis fünfzehn Proben eingefroren sind, werden sie unter NL in der zugedeckelten Stahlscheibe bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.2.2) Kryosubstitution

Die Kryosubstitution hat die Aufgabe, das zu Eis gefrorene Zellwasser aus dem Objekt bei der sehr tiefen Temperatur von -80°C zu entfernen. Mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel, die bei dieser Temperatur noch flüssig sind, lösen das Eis langsam auf und treten im biologischen System an seine Stelle, so daß die Morphologie zum Zeitpunkt des Einfrierens erhalten bleibt. Die Proben können diesem Präparationsschritt entweder sofort nach dem Einfrieren oder nach einer längeren Aufbewahrung unter NL zugeführt werden.

Der Arbeitsgang gliedert sich in den Transfer des gefrorenen Objektes aus NL in das auf -80°C gehaltene Substitutionsmedium, ein längeres Belassen der Probe bei dieser Temperatur und schließlich das langsame Anwärmen des mittlerweile entwässerten Objekts.

Mit folgenden Materialien wurde die Kryosubstitution (KS) durchgeführt:

großes Weithals-Dewargefäß (Ø 20 cm)
kleines Weithals-Dewargefäß (Ø 7 cm)
2 ml-Beckman-Zentrifugenröhrchen mit Deckel aus Polyethylen
Alu-Block (Ø 5 cm, Höhe 5 cm) mit vier Bohrungen zur Aufnahme von je einem Bekman-Röhrchen
Gerät Cryo-Cool CC80 (Neslab, Portsmouth/USA) mit Kältebad; Das Gerät kann von -70°C aufwärts auf jeden Temperaturwert eingestellt, sowie auf eine bestimmte Temperaturkurve programmiert werden. Normalerweise dient es zum langsamen kontrollierten Einfrieren von gefriergeschützten Zellen.
Schütteigerät REAX (Heidolph, Köln)
Trockeneis zum Einstellen der Substitutionstemperatur von -80°C; Die Firma Agefko (Nürnberg) vertreibt das Trockeneis in Form von massiven, ungefähr 5 kg schweren Blöcken. Noch beim Hersteller wurden diese Blöcke in Platten (10x10 cm) von zwei Zentimeter Dicke geschnitten. In unserem Kühlraum wurden diese Platten zu einem groben Granulat zerstoßen, welches sodann in das große Dewar-Gefäß gepackt als Reservoir für annähernd zehn Tage ausreichte.
Methanol, p.a. 99,5% (Roth, Karlsruhe)
Aceton für Spektroskopie "Gold Marke", 99%+ (Aldrich-Chemie, Steinsheim)
Molekularsieb-Granulat, 0,4 nm (Brenntag AG, Mühlheim/Ruhr); Das Molekularsieb nimmt, als Trocknungsmittel organischen Lösungsmitteln zugesetzt, Wasser in seine Poren auf. Hierzu muß es vorher im Trockenschrank bei 110°C aktiviert werden. Die Lösungsmittel Aceton und Methanol werden in Glasschliff-Flaschen über aktiviertem Molekularsieb aufbewahrt, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sie stets in wasserfreiem Zustand zur Verwendung gelangen. Nicht zugesetzt wird das Molekularsieb dem Substitutionsmedium, da seine Wechselwirkungen mit gelöstem Osmium zu noch größerer

Instabilität bei diesem Fixans führen sollen (Steinbrecht, 1985).

Glutaraldehyd 50%-ige wässerige Lösung (Serva, Heidelberg)
Osmiumtetroxid reinst in Ampullenform (Roth, Karlsruhe)
Uranylacetat p.a. (Merck, Darmstadt)

Für die KS wurden zwei verschiedene Medien verwendet. Das eine Medium, bestehend aus 3% GA /1% OS / 0,5% Uranylacetat in Methanol, führten Müller et al. (1980) ein, das andere Medium ist eine Lösung aus 1-4% OS in wasserfreiem Aceton (van Harreveld und Crowell, 1964; Ito und Ichikawa, 1982). Die Substitutionsgemische wurden zu den Versuchen meist frisch hergestellt, sie können aber auch in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden. Für eine normale Einfriercharge erwiesen sich insgesamt 10,0 ml an Medium als ausreichend.

Bei der Herstellung des methanolischen Mediums ist Vorsicht geboten, wegen der hohen Reaktivität der Komponenten ist nach Möglichkeit wie folgt zu verfahren: Zwei Erlenmeyer-Kölbchen werden über NL vorgekühlt. In dem einen Kölbchen werden 8,8 ml einer Uranylacetat-Lösung (1% G/V in Methanol) mit 1,2 ml 50%-iger GA-Lösung vermischt. In dem anderen Gefäß wird der Inhalt zweier 100 mg-Ampullen Os in 10,0 ml Methanol gelöst, was, im Gegensatz zum Lösen in Wasser fast augenblicklich vonstatten geht. Beide Kolbeninhalte werden in Trockeneis getrennt auf etwa -75°C heruntergekühlt, sodann vereint und unter kräftigem Schütteln vermischt. Jetzt werden möglichst rasch mehrere Beckman- Röhrchen jeweils zu zwei Dritteln mit dem fertigen Substitutionsmedium befüllt, verschlossen und sofort unter NL eingefroren. Nur in gefrorenem Zustand ist dieses Gemisch stabil, während bereits bei -30°C der Aldehyd das Osmium nach wenigen Stunden zu reduzieren beginnt (Humbel, persönl. Mitteilung). Mit der 50%-igen GA-Lösung werden zwar 1,5% Wasser in dieses Substitutionsgemisch eingebracht, aber Methanol vermag bei -80°C immerhin bis zu 10% Wasser aufzunehmen (Humbel et al., 1983). Durch diesen geringen Wassergehalt wird also die große Substitutionskapazität dieses Lösungsmittels nicht beeinträchtigt.

Das Aceton dagegen ist bei -80°C nicht in der Lage, mehr als 1-2% Wasser zu substituieren (van Harreveld et al., 1965; Humbel et al., 1983). Bei der Mediumzubereitung und beim späteren Arbeiten mit diesem Lösungsmittel ist sorgfältig darauf zu achten, daß keinerlei Luft-

feuchtigkeit über den geöffneten Medienröhrchen kondensieren und damit zusätzliches Wasser in die Proben gelangen kann. In einem trockenen Kolben werden 200,0 oder 400,0 mg OS in 10,0 ml absolut wasserfreiem Aceton gelöst und die Lösung dann in 1,5 ml-Portionen auf Beckman-Röhrchen verteilt. Die verschlossenen Röhrchen werden sofort in NL eingefroren.

Für die KS wird der Alu-Block in das kleine, mit Trockeneis gefüllte Dewar gepackt. Zur Erhöhung der thermischen Leitung zwischen Kühlmittel und Block wird das Trockeneisgranulat mit einer größeren Menge Aceton (gewöhnliche Qualität) versetzt. Die Medienröhrchen werden in der erforderlichen Anzahl in die Blockbohrungen gestellt und erst unmittelbar vor dem Probentransfer geöffnet. Dabei ist besonders geschickt und rasch zu verfahren, um die gefrorenen Objekte nicht unzulässig zu erwärmen: Aus den Bohrungen der Stahlscheibe wird unter NL mit einer vorgekühlten Pinzette ein Trägernetzchen mitsamt dem daran haftenden gefrorenen Häutchen entnommen und auf kürzestem Weg in das Probenröhrchen mit dem inzwischen verflüssigten -80°C kalten Substitutionsgemisch übertragen. In ein Röhrchen werden etwa fünf Trägernetzchen gegeben, dieses dann unverzüglich verschlossen und der Inhalt kurz am Schüttelgerät durchgewirbelt.

Diese aufgrund der Gefahr des zwischenzeitlichen Erwärmens der Probe sehr heikle Art des Transfers kann elegant umgangen werden: Stellt man den Alu-Block mit den Probenröhrchen bereits bei der Kryofixierung mit in das Kältebad, dann können die Trägernetzchen unmittelbar nach dem Herausziehen der Tuschefeder aus dem Propan noch innerhalb der kalten Stickstoffgasatmosphäre in das Röhrchen mit dem gefrorenen Substitutionsmedium fallen gelassen werden. Die zwar kurze aber riskante Probenpassage durch die Raumluft, die bei dem oben geschilderten Verfahren unvermeidlich ist, entfällt hier also. Der große Nachteil der zweiten Vorgehensweise liegt aber einerseits in der zwangsläufigen Feuchtigkeitskondensation über den geöffneten Probenröhrchen, da man doch längere Zeit mit der warmen Hand im kalten Gasraum manipulieren muß. Andererseits werden auch mitsamt den Proben nicht zu vernachlässigende Mengen an Flüssigpropan in das Substitutionsgefäß eingetragen. Beim späteren Anwärmen auf über -42°C , dem Siedepunkt von Propan, verflüchtigt sich das Gas zuweilen spon-

tan und heftig, was zum Verlust der Proben führt. Zumindest beim Arbeiten mit dem sehr feuchtigkeitsempfindlichen Aceton ist deshalb die erstgeschilderte Art des Transfers anzuraten.

Nachdem der Alublock mitsamt den beschickten Röhrchen in dem mit Trockeneis gefüllten Dewar-Gefäß untergebracht ist, wird dieses verschlossen. Es ist von Vorteil, das Behältnis dann in eine Tiefkühltruhe (-30°C) zu stellen, da die dort sehr niedrige Umgebungstemperatur den Zerfall des Trockeneises zusätzlich verzögert.

Während der nun ablaufenden KS müssen mehrmals der Trockeneispegel überprüft und die Röhrchen kurz durchgeschüttelt werden.

In Anbetracht der schlecht permeablen Zygotenzellwand wurde mit Methanol zunächst drei Tage, mit Aceton dagegen sechs Tage lang substituiert. Später stellte sich jedoch die KS-Dauer als nicht ausschlaggebend heraus, was auch mit den Befunden von Steinbrecht (1982) in Einklang steht, so daß beim Methanol nur noch einen Tag, beim Aceton drei Tage lang substituiert wurde.

Die nun tieftemperaturentwässerten Proben müssen nun zur weiteren Präparation, die bei Raumtemperatur stattfinden soll, zunächst auf 0°C gebracht werden. Dies soll nicht abrupt erfolgen, sondern sich über die genügend lange Zeitspanne von acht Stunden erstrecken (Steinbrecht, 1982). Des weiteren sollte währenddessen die Reaktionskinetik der im KS-Gemisch enthaltenen chemischen Fixantien berücksichtigt werden: Nach jetzigem Erkenntnisstand sind diese bei -80°C noch inaktiv. GA beginnt dann ab -50°C langsam mit Proteinen zu reagieren und fixiert diese dann ab -30°C bereits mit beträchtlicher Rate (Humbel et al., 1983). Bezüglich des OS existieren leicht divergierende Meinungen (Feder und Sidman, 1958; Hereward und Northcote, 1970; Barlow und Sleigh, 1979), die aber dahingehend zusammengefaßt werden können, daß es unterhalb von -20°C zu keiner nennenswerten Fixierung befähigt ist. Es gibt aber auch unveröffentlichte Erkenntnisse, die schon bei -90°C für OS und Uranylacetat ein langsames Reagieren vermuten lassen (Müller, persönl. Mitteilung). Aufgrund dieser Befunde sollte den chemischen Fixantien bereits bei sehr niedrigen Temperaturen ausreichend Zeit zur hier noch besonders schonenden Strukturstabilisierung gewährt werden, und deshalb

wird der Temperaturanstieg nicht linear vollzogen, sondern bei verschiedenen Zwischentemperaturen längere Zeit unterbrochen.

Zunächst ist das mit Methanol (gewöhnliche Qualität) befüllte Kältebad des Einfriergerätes Cryocool CC80 auf -70°C herunterzukühlen und dann der Alu-Block mitsamt den Proben in das Kältebad einzuhängen. Mittels der thermofühlergesteuerten Kühlschlange kann nun langsam aufgeheizt werden, bis nach ungefähr sechs Stunden 0°C erreicht sind, wobei bei -50°C und -30°C die Temperatur für jeweils eine Stunde konstant gehalten wird. Die mittlerweile vom OS braun gefärbten Proben bleiben noch zwei Stunden bei 0°C, dann werden sie in einem Eisbad zweimal kurz mit reinem wasserfreien Lösungsmittel gewaschen. Anschließend überträgt man sie in wasserfreies Aceton von 0°C. Diesem wird langsam und unter Schütteln tropfenweise das gleiche Volumen Spurr-Einbettungsmittel von Raumtemperatur zugegeben, so daß ein schonender Temperaturanstieg der Probe erfolgen konnte. Die weiteren Einbettungsschritte genügten nachfolgendem Schema. Dabei wurden die Objekte durch Abzentrifugieren (Beckman -Zentrifuge) und anschließendes vorsichtiges Abheben des Überstandes mit einer Pasteurpipette von ihrem jeweiligen Medium abgetrennt:

Medium bei Raumtemperatur	Zeit unter Rotation
Spurr / Aceton 1:1	zwei Stunden
Spurr / Aceton 3:1	zwei Stunden
Spurr 100%	mindestens acht Stunden
Spurr 100%	2x zwei Stunden

Erst jetzt werden die Zygotenhautstückchen, die während der ganzen Präparation recht gut an den Trägernetzchen haften blieben, mit einer Präpariernadel vorsichtig abgelöst. Die Häutchen werden einzeln in Silikongießformen (Balzers, Liechtenstein) flach eingebettet und die Blöckchen bei 60°C mindestens acht Stunden lang ausgehärtet.

2.4) Serienschnitt-Technik und Elektronenmikroskopie

Die objekthaltige Seite der hart auspolymerisierten Blöcke wird an der Trimmvorrichtung TM 60 (Reichert, Wien) zu einem pyramidenförmigen Stumpf zurechtgefräßt. Es ist besonders darauf zu achten, daß die Ober- und Unterkante der dabei hergestellten Anschnittfläche exakt parallel angelegt werden. Ist die Unterkante später auch parallel zur Schneide des im Ultramikrotom OMU-2 (Reichert, Wien) installierten Glasmessers orientiert, ergeben sich beim Schneiden gut eingebetteter Proben längere Bänder aus

50-100 Dünnschnitten, deren Interferenzfarbe am thermischen Vorschubregler des Gerätes auf hellgold eingestellt wird. Die kryofixierten Häutchen werden dank der Flacheinbettung immer quer geschnitten, so daß die erwartungsgemäß gut eingefrorenen äußeren Gewebeabschnitte leicht aufgefunden werden können. Der Schneidevorgang wird erst abgebrochen, sobald die Schnitte nicht mehr als Band gleichmäßig von der Messerkante herunterlaufen. Dann muß der Objektblock an eine frische Stelle der Messerschneide herangefahren werden. Bevor das Mikrotom erneut gestartet wird, sind zunächst die bisher erhaltenen Schnitte auf pioloformbeschichtete Lochgrids (Veco, Solingen) aufzunehmen. Die Lochabmessungen dieser Grids ermöglichen es, daß im günstigsten Fall bis zu vier Bänder nebeneinanderliegend auf dem Folienfeld von 1 x 2 mm Platz finden. Hierzu wird das auf der Wasseroberfläche schwimmende lange Schnittband zerteilt und die Bruchstücke werden im Trog bereits so arrangiert, wie sie später auf dem Trägernetzchen zum Liegen kommen sollen. Als Manipulationswerkzeug dient dabei eine an einer Pasteurpipette fixierte Teflonspitze. Diese wird hergestellt durch das Auseinanderziehen eines Stückchens Teflonband zu einem Faden. Erst jetzt werden die durch den Schneidedruck gestauchten Schnitte geglättet. Dies erfolgt mittels eines xyloldurchtränkten Filterpapierstreifens, der in geringem Abstand kurz über die Schnitte gehalten wird. Nach einer nochmaligen Lagekorrektur der nun silberfarbenen Schnitte können diese mit dem Grid aufgefischt werden.

Zum Nachkontrastieren der Schnitte nach Venables und Coggeshall (1965) gelangen diese jeweils für 10 Minuten zunächst in Uranylacetat (10% G/V in Methanol), danach im stickstoffdurchströmten Exsikkator in Bleicitrat (0,2% G/V in aqua bidest.). Benutzt wird hierzu das Hiraoka Staining Kit (Polysciences, Paesel, Frankfurt), bestehend aus drei Färbeschälchen und einem Gridhalter, in dem alle Trägernetzchen einer Schnittserie bequem Platz finden.

Für die Elektronenmikroskopie und die Zellphotographie wird das EM-10 (Zeiss, Oberkochem) verwendet. Die Zellserien werden auf Agfa Ortho Planfilm (6,5 x 9,0 cm) bei einer Primärvergrößerung von 6200x abphotographiert. Die Sekundärvergrößerung bei bei den Papierabzügen beträgt je nach gewähltem Format zwischen

2,0x und 3,25. Aufgrund der großen Kontrastunterschiede innerhalb der Zygotenzellwand und zwischen Zygotenzellwand und Protoplast gestaltet sich die Anfertigung der Abzüge phototechnisch sehr problematisch, so daß als Papier alle Gradationen von Agfa Brovira und zusätzlich Argenta 851w herangezogen werden müssen. Teilweise ist sogar eine vorherige Umentwicklung der Negative nach Behandlung mit Contrastcorrector (Tetenal, Hamburg) notwendig.

2.5) Auswertung der Schnittserien
Zunächst wird für jede Schnittserie die durchschnittliche Schnittdicke in Anlehnung an Arnold und Gaffal (1979b) ermittelt: Bei einem annähernd kugelförmigen Körper, wie ihn die Chlamydomonas-Zygote darstellt, führt der Quotient aus dem größten Durchmesser dieser Kugel und der Anzahl der Schnitte, die zur vollständigen Erfassung dieser Kugel nötig sind, mit ausreichender Genauigkeit zu der mittleren Schnittdicke $\bar{d}$.

In der vorliegenden Arbeit gliedern sich die Auswertungsmethoden auf in die graphische dreidimensionale Rekonstruktion, die Morphometrie und den Modellbau und haben in erster Linie die Ermittlung von Zahl, Volumen und Morphologie der Mitochondrien zum Ziel.

2.5.1) Graphische dreidimensionale Rekonstruktion
Von Zellwand,Protoplast, Kern und Mitochondrien einer jeden Aufnahme einer Schnittserie werden die Umrisse vom Papierabzug auf Transparentpapier übertragen. Das Aufeinanderstapeln der so erhaltenen Profile in räumlich korrekter Orientierung gestattet es, den Verlauf der interessierenden Struktur von Schnitt zu Schnitt durch die Zelle zu verfolgen. Bezüglich der Mitochondrien erlaubt die Bezifferung der Profile und die protokollarische Erfassung des Neuauftretens, des Verschwindens und der Vereinigung der Anschnitte zunächst die Feststellung der Mitochondrienzahl. Hiermit ist aber auch ein Überblick über die Verteilung der Organelle innerhalb der Zelle möglich.

2.5.2) Morphometrie
Hierzu steht das automatische Bildanalysesystem MOP-Digiplan (Kontron, München) zur Verfügung. Durch Flächen- und Umfangsmessung der einzelnen Profile können damit das absolute Volumen und die absolute Oberfläche des interessierenden Objektes

ermittelt werden: Die Multiplikation der Flächensummen mit ∂ führt zum Volumen, das Produkt aus Umfangssumme und ∂ ergibt die Oberfläche des untersuchten Körpers.

Aufgrund der Dicke eines jeden Schnittes wird jedoch ein teilweise schwerwiegender systematischer Fehler in diese quantitativen Erhebungen eingebracht, der, je nach Objektdurchmesser, zu einer beträchtlichen Volumenüber- und Oberflächenunterschätzung führt. Bei Gaffal et al. (1982) sind die Möglichkeiten zur Korrektur dieser Fehler zusammengefaßt. So ist zum Beispiel die Bereinigung eines morphometrisch ermittelten Volumenwertes geboten, wenn der Durchmesser des untersuchten Objektes das Zehnfache der Schnittdicke unterschreitet, was bei den Mitochondrien der Chlamydomonas-Zygote der Fall ist. Der dabei einzusetzende Korrekturfaktor wird erhalten nach der Formel:

$$K_o = 1 + \frac{3\,T}{2\,D},$$

wobei sich T auf die mittlere Schnittdicke und D auf den mittleren Durchmesser der sehr kleinen Individuen einer Mitochondrienpopulation beziehen.

Eine Fehlerkorrektur ist auch erforderlich bei den Werten für die Oberfläche der Zellkerne (siehe Gaffal et al., 1982).

Neben den Volumina und Oberflächen von Mitochondrien, Kernen und Protoplasten wird auch der Wert für die mittleren kurzen Achsen (m.k.A.) der Mitochondrienprofile bestimmt. Letzterer erlaubte bei Polytoma papillatum in Verbindung mit dem Oberflächen : Volumen-Verhältnis einen Hinweis, aus welcher Art von Einzelbausteinen sich das Chondriom zusammensetzt. Entspricht das Oberflächen : Volumenverhältnis (S/V) dem Quotienten 4 : m.k.A., bilden zylinderförmige Einzelmitochondrien das Chondriom, bei S/V = 6 : m.k.A dagegen stellen sphärische Einzelmitochondrien die Individuen der Population dar (Gaffal et al., 1982). Für Chlamydomonas ist die Gültigkeit dieser Beziehungen noch nicht erwiesen.

2.5.3) Modellbau

Den genauesten Einblick in die Morphologie eines jeden einzelnen Mitochondriums liefert noch immer der allerdings sehr zeitaufwendige Modellbau. In der vorliegenden Arbeit werden von zwei Zygoten der komplette Mitochondrienbestand,

von einer Zelle aber lediglich die größten Einzelmitochondrien als Modell vorgestellt. Ziel dieser Arbeiten ist es, das Zygoten-Chondriom nach verschiedenen morphologischen Typen qualitativ und quantitativ aufzulisten und die Ergebnisse mit den Befunden von Grobe (1976) und Grobe und Arnold (1977) zu vergleichen.

Die Modellvergrößerung ergibt sich aus dem Verhältnis der mittleren Schnittdicke $\bar{d}$ zur Dicke der beim Modellbau verwendeten Styroportapete (3 mm). Bei einer mittleren Schnittdicke von 0,08 µm ergibt sich damit eine Modellvergrößerung (Tertiärvergrößerung) von 37000x. Zunächst müssen mit Hilfe eines Negativvergrößerers die in der Sekundärvergrößerung auf Transparentpapier abgezeichneten Mitochondrienprofile auf die Tertiärvergrößerung gebracht werden. Beim Übertragen der Mitochondrienprofile auf die Styroportapete können wegen der zu hohen Sekundärvergrößerung die Zellumrisse als spätere Orientierungshilfe nicht mitgezeichnet werden. Stattdessen werden zur exakten räumlichen Orientierung der Mitochondrienanschnitte für jedes Organell zwei fiktive Hilfsachsen als räumliche Bezugsstruktur eingeführt, deren Einzelpunkte ebenfalls auf die Styroportapete abgezeichnet werden. Nach dem Ausschneiden der Mitochondrienprofile mit einer Thermosäge (Fischertechnik, Tumlingen) müssen diese paßgenau mit Styroporkleber (UHU, Bühl) zusammengeklebt werden. Als Schablone dienen dabei die Styroporstückchen mit den Löchern, die durch das Herausschneiden der Organellenprofile entstehen. Diese Styroporstückchen tragen auch die Punkte der Hilfsachsen. Durch diese werden Nadeln gespießt, damit die Stückchen von aufeinanderfolgenden Schnitten in korrekter Orientierung zusammengeheftet werden können. Nach dem Zusammenfügen aller Modellteile wird auf das Glätten der Kanten und die Begradigung leichter Unregelmäßigkeiten, die meist durch unterschiedlich stark gespreitete Schnitte entstehen, verzichtet.

3) Vorbemerkungen und Überlegungen

Vor der Schilderung der experimentellen Ergebnisse seien an dieser Stelle einige Randfragen zum Untersuchungsobjekt und deren Abklärung als Ergebnis von Literaturrecherchen und eigenen Überlegungen angeführt. Dies ist erforderlich, um für die vorliegenden und auch für mögliche spätere Untersuchungen eine gemeinsame Ausgangsbasis zu schaffen.

3.1) Synchronisierung des vegetativen Zellwachstums?

Fast alle Autoren elektronenmikroskopischer Untersuchungen an Chlamydomonas Zygoten gehen von hell / dunkel-synchronisierten vegetativen Kulturen aus (Cavalier-Smith, 1976; Triemer und Brown, 1976; Grobe und Arnold, 1977; Minami und Goodenough, 1978). Motiv hierfür ist es einerseits, durch die damit erhaltene homogene Gametenpopulation eine hohe Kreuzungsrate und folglich eine hohe Zygotenausbeute zu erzielen. Andererseits sollen auf diese Weise Zygotenkulturen aus Individuen des gleichen Stadiums erhalten werden, was bei der Beschreibung von Zelldifferenzierungsvorgängen oder von der Meiose die Repräsentativität der Einzelbeobachtungen für die ganze Kultur erhöht. In der vorliegenden Arbeit war beabsichtigt, zunächst die reife, sechs Tage alte Zygote als das wohl am schwierigsten zu fixierende Zygotenstadium zu untersuchen. Hierzu wurde bewußt auf die doch aufwendige Synchronisierung des vegetativen Zellzyklus mittels Kniese-Appararatur verzichtet. Zum einen befinden sich mit dem Stickstoffentzug und dem Kreuzen zwei relativ kurz hintereinandergeschaltete synchronisierende Momente ohnehin in der Anzuchtperiode, so daß allein schon dadurch eine recht homogene Zygotenpopulation zustande kommen sollte. Zum anderen ist anzunehmen, daß eine in die Zygotenreifungsphase eingebrachte Synchronität während der langen Reifungsdauer von sechs Tagen wieder verloren geht, oder umgekehrt, die langdauernden konstanten Reifungsbedingungen bei ursprünglich asynchronen Kulturen eine Gleichschaltung bewirken. Bei reifen oder gar noch älteren Zygoten scheint eine Synchronisierung also unangebracht.

3.2) Art der Zygotenkultivierung?

Es ist möglich, reife Chlamydomonas-Zygoten sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur in Form der sogenannten Kahmhaut zu erhalten (Cavalier-Smith, 1974). Werden Chlamy-

domonas-Zygoten in der Literatur angeführt, dann fast ausschließlich im Zusammenhang mit den von Ruth Sager eingeführten genetischen Untersuchungen an isolierten Zygoten. Hierbei werden die Zygoten stets auf Platten kultiviert, da es nur auf diesem Wege möglich ist, einzelne Zellen methodisch und auswertetechnisch zugänglich zu machen. Weiterhin sollen in Flüssigkultur angezogene Zygoten wesentlich schlechter auskeimen (Cavalier-Smith, 1974) sind als sehr heterogene Population morphologisch in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden können (Cavalier-Smith, 1976; siehe auch Seite 32).

Es durfte also keineswegs davon ausgegangen werden, daß Zygoten von Platten und Zygoten aus Flüssigkultur beliebig austauschbar sind, und eine Kulturform auch repräsentativ für die andere sein kann. Wenn in der vorliegenden Arbeit fast nur flüssig kultivierte Zygoten eingesetzt werden, so läßt sich die Entscheidung für diese ansonsten völlig ungebräuchliche Art der beiden möglichen Anzuchtformen wie folgt begründen:

Mit dem Zygotenhäutchen hat man ein reines Zygotenpräparat zur Verfügung, da sich nur Kreuzungsprodukte in der Kahmhaut anreichern (Sager, 1955). Verunreinigungen mit vegetativen Zellen und mit ungekreuzten Gameten, die bei der Plattenkultur nicht zu vermeiden sind, können ausgeschlossen werden. Es bedeutet eine große Arbeitserleichterung, beim Durchmustern der Schnitte am EM voraussetzen zu können, daß jeder der beobachteten Zellanschnitte auch der gewünschten Zellzyklusphase entstammt.

Das Zygotenhäutchen ist zudem eine vorteilhaftere Objektform für den elektronenmikroskopischen Präparationsgang. Die Zellen können problemlos und in hoher Ausbeute aus der Kultur abgeerntet werden, da eine Hautbildung unabhängig von der Kreuzungsrate immer stattfindet. Als stabiles Pseudo-Gewebe ist das Häutchen bei den verschiedenen Arbeitsschritten bequem zu handhaben, Techniken wie Zentrifugieren oder Pipettieren erübrigen sich. Bei der Kultivierung auf Platten dagegen müssen die Zellen recht mühsam vom Agar abgekratzt werden, da die äußeren Zygotenwandschichten sehr fest daran kleben (Cavalier-Smith, 1976). Bei niedrigeren Kreuzungsraten werden mehr Gameten als Zygoten von den Platten abgenommen. Es gelangt dann

nur wenig Zygotenmaterial in die Proben, was das Auffinden auswertbarer Zellen sehr erschwert.

Ein großer Unterschied zwischen beiden Zygotentypen besteht auch hinsichtlich ihrer Ultrastruktur. Aufgrund der Abbildung in der Arbeit von Cavalier-Smith (1976) und einer eigenen Präparation von auf Platten gereiften Zygoten (Abb.5,6) kann trotz der sicherlich nicht optimalen Fixierungsqualitäten zu Recht behauptet werden, daß die natürliche Innenstruktur von Plattenzygoten jegliches Auswerten von Mitochondrien in Schnittserien verunmöglicht. Das mit Stärkekörnern und Lipidkörpern dichtgepackte Cytoplasma besitzt kaum Membranen, weil diese im Zuge der Zygotenreifung bei Plastide, Golgi-Apparaten, endoplasmatischem Retikulum und Vakuolen entdifferenzieren (Cavalier-Smith, 1976). Die zu geringfügigen Kontrastunterschiede im Cytoplasma und das Fehlen der Mitochondrienmembranen gestatten kein Erkennen der Mitochondrienanschnitte. Bereits wenige eigene Experimente gaben dagegen Anlaß zu der Hoffnung, daß an Zygoten aus Flüssigkulturen die biologische Fragestellung der vorliegenden Arbeit bei weiterer Optimierung der Fixierungsqualität bearbeitet werden kann, da ein großer Teil einer solchen Zellpopulation ein gut ausdifferenziertes Cytoplasma besitzt.

Das abschließende Argument für die Verwendung von Flüssigkulturen wurde bereits einleitend erwähnt (siehe Seite 6): Oberstes Ziel von Untersuchungen der Mitochondrienmorphologie muß es sein, das Chondriom in möglichst lebensnahem Zustand zu erfassen. Dies schließt aber auch die Forderung mit ein, daß die die Mitochondrien beherbergenden Zellen unter möglichst lebensnahen Bedingungen gehalten werden. Die Plattenkultivierung ist aber lediglich eine aus methodischer Notwendigkeit geborene Labortechnik und kein natürlicher Lebensraum für einen ansonsten in Pfützen und Tümpeln frei schwimmenden Süßwasserflagellaten.

In diesem Zusammenhang darf auch nicht unerwähnt bleiben, daß erst vor kurzem an einem anderen Phytoflagellaten gezeigt werden konnte, daß der Wechsel von Flüssig- auf Plattenkultur zu Veränderungen am Chondriom, wie Reduzierung der mittleren kurzen Achsen, Zunahme der Oberfläche oder Umbau der Cristae führt (Gaffal et al., 1986). Dieser Befund und die oben angeführten Überlegungen unterstreichen die Notwendigkeit, die geplanten

Untersuchungen zum Mitochondrienzyklus in der Zygote durch die Festlegung auf dasjenige Kultivierungsverfahren, bei dem die Erfordernisse der methodischen und biologischen Fragestellung weitestgehend Berücksichtigung finden, zu standardisieren.

3.3) Einsatz von Mutanten?

Da die schlecht permeable Zygotenwand den limitierenden Faktor für eine zufriedenstellende Fixierung der Mitochondrien darstellt, bietet es sich an, diese Barriere durch den Einsatz von geeigneten Mutanten zu umgehen: Die mittlerweile in verschiedenen Zell-Linien routinemäßig kultivierbaren zellwandlosen Chlamydomonas-Mutanten (Gresshoff, 1976) sollten eigentlich beim Kreuzen ihrer Gameten zu ebenfalls zellwandlosen Zygoten führen, die sich dann problemlos fixieren lassen müßten. Dieser sicherlich elegante Lösungsweg mußte aber aufgegeben werden bei der Kenntnisnahme der Befunde von Davies und Plaskitt (1971), die festgestellt hatten, daß Zygoten solcher Mutanten voll ausgebildete, denen des Wildtyps entsprechende Zygotenwände besitzen. Die Autoren wiesen darauf hin, daß die Gene, welche während des haploiden Zellzyklus für die Zellwandbildung und damit für die Manifestation des Mutantencharakters verantwortlich sind, nicht identisch sind mit den Genen, die während der diploiden Zellzyklusphase die Zygotenwandsynthese codieren. Damit findet auch der völlig andersartige Aufbau der Zygotenwand verglichen mit der Wand vegetativer Zellen seine Begründung.

4) Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wird die Bearbeitung der methodischen, sodann die Auseinandersetzung mit der biologischen Fragestellung der vorliegenden Arbeit geschildert.

4.1) Methode

Bei der Suche nach der geeigneten Fixationsmethode für die reife Chlamydomonas-Zygote wurden verschiedene Wege beschritten. Im Folgenden wird der Ablauf dieses rein methodischen Teils der Arbeit dargelegt. Die Durchführung der verschiedenen Versuche wird zunächst mit Hinweisen aus der Literatur und eigenen Überlegungen begründet, anschließend werden die damit erhaltenen Ergebnisse anhand repräsentativer Abbildungen demonstriert. Bei der Beurteilung der Qualität einer Fixierung war neben dem allgemeinen Erhaltungszustand der Zelle besonders darauf zu achten, daß eine artefaktfreie Darstellung und eine zuverlässige morphometrische Auswertbarkeit der Mitochondrien gegeben waren.

4.1.1) Versuche zur chemischen Fixierung

Um eine ausreichende Menge an Fixantien durch eine schlecht permeable Zellwand zu schleusen, wurden drei Varianten ausgetestet: Lange Fixierungszeiten, Verminderung der Barrierefunktion durch geeignete Vorbehandlung der Zellwand und Einsatz besonders gut penetrierender Fixantien.

4.1.1.1) Lange Fixierungszeiten

Minami und Goodenough (1978) bezeichneten langes Fixieren als unerlässlich für eine ausreichende Erhaltung der Zellstrukturen der Chlamydomonas-Zygote. Im Rahmen einer anderen Fragestellung fixierten sie 24 Stunden in 2% GA und vier Stunden in 1% OS. Wegen der langen Verweilzeiten der Probe in den Fixierlösungen besteht die Gefahr übermäßiger Extraktion. Hier soll die Verwendung von HEPES-Puffer aufgrund geringerer Entzugswirkung auf Proteine und Phospholipide für eine im Vergleich zu anderen Puffern deutlich dichtere Strukturerhaltung sorgen (Hayat, 1981). Selbst bei einer sehr geringen Diffusionsrate sollten diese Fixierungszeiten ausreichen, um das Eindringen der Menge an chemischen Agentien zu ermöglichen, die die Strukturen gegen die nachfolgenden Präparationsschritte stabilisiert. Im Zuge dieser Versuche kam als Drittfixans auch Gerbsäure zum

Einsatz (siehe Tab.1 Seite 13). Wegen des dichtgepackten und nur geringfügige Kontrastunterschiede aufweisenden Zygotencytoplasmas sollte sie die Identifizierung schwer erkennbarer einzelner Organelle begünstigen, da sie Substrukturen durch ihren ätzenden Effekt mehr Plastizität verleiht und deutlicher hervorteten läßt (Bullock, 1984).

Die mit langen Fixierungszeiten erhaltenen Ergebnisse bestätigen zunächst die Befunde von Cavalier-Smith (1976). In Flüssigkultur gereifte Zygoten können aufgrund ihrer unterschiedlichen Anatomie in drei Klassen eingeteilt werden (Abb.7-12):

- # Zygoten, die morphologisch den auf Agarplatten gereiften Zellen entsprechen. Ihr Cytoplasma ist aber so stark entdifferenziert, daß die Mitochondrien nicht identifiziert werden können (Abb.7, vgl. auch Abb.5,6).
- # Zygoten, in deren weniger entdifferenziertem Cytoplasma eine große Vakuole dominiert. Durch diese Vakuole bleibt wenig Raum für die restlichen Organelle (Abb.8).
- # Zygoten mit einem kompartimentierten Cytoplasma, erkennbaren Membranen und Organellen (Abb.9-12). Auch hier sind Vakuolen enthalten. Diese sind aber nicht so störend groß wie bei obigem Zelltyp.

Letztere Zygotenklasse ist für die geplanten Untersuchungen geeignet.

Bei diesen Fixierungsversuchen waren neben der teilweise befriedigenden Strukturerhaltung von Plastide, Pyrenoid und Zellkern die schlecht sichtbare Cytoplasmamembran und die manchmal kaum kontrastierte Zygotenwand erwähnenswert. Das Ausmaß an Extraktion konnte durch den Einsatz von HEPES-Puffer tatsächlich gering gehalten werden, doch weisen auffallend viele Zygoten Zeichen starker Schrumpfung auf, ihr Protoplast hat sich von der Zellwand abgelöst (Abb.10,12). Die Mitochondrien sind in der grobkörnigen und wohl stark denaturierten Cytoplasmamatrix auch nach Gerbsäurefixierung nur sehr schwer auszumachen. Die Cristae erscheinen als diffuse helle Flecken innerhalb der Organellenmatrix und lassen eine artefizielle Schädigung vermuten.

4.1.1.2) Fixierung nach Vorbehandlung

Als anderer Lösungsweg bot es sich an, die Barrierewirkung der Zygotenwand zum einen durch Zellwandlyse, zum anderen durch

Störung der Zellwandbildung herabzusetzen, damit die Fixantien ungehinderter in die Zelle penetrieren konnten. Diese Vorbehandlungen lassen sich anhand des derzeitigen Erkenntnisstandes bezüglich der Zygotenwandentstehung und der Zygotenwandzusammensetzung begründen:

Die Zygotenwand besteht zu 25% aus einem noch nicht bekannten unlöslichen Anteil, die restlichen 75% werden von Glykopolypeptiden (GpP) gebildet (Minami und Goodenough, 1978; Catt, 1978). Sie ist cellulosefrei und das Aminosäuremuster des GpP-Anteils unterscheidet sich deutlich von dem der Wände vegetativer Zellen und Gameten. Der Wandbildungsmechanismus setzt ein bei den Golgi-Dictyosomen. In diesen sammelt sich fibrilläres Material an, welches in Vesikel abgeschnürt und dann in die Zellperipherie abtransportiert wird, um schließlich in den Extrazellularraum sezerniert zu werden. Dort formiert es sich an der Zelloberfläche in Form unlöslicher GpP-Fasern zu mehreren Zellwandschichten (Minami und Goodenough, 1978). Diesen Autoren gelang es auch, durch längers Schütteln einer jungen Zygotensuspension einen großen Anteil an fibrillärem Zellwandmaterial zu isolieren, da dessen Zusammenlagerung während der kontinuierlichen Schüttelbewegung nicht möglich war. Folglich ist anzunehmen, daß sich durch dieses Schütteln die Zygotenwand nur unvollständig bildet oder lockerer gefügt ist, und sich die Zygoten nicht zu einer Kahmhaut organisieren, sondern als Zellsuspension freier für Fixantien zugänglich sind. Das Schütteln einer Zygotenkultur während der Periode der Zellwandbildung sollte deshalb als die eine Vorbehandlung Einsatz finden (siehe Tab.1 / 3, Seite 13).

Die andere Vorbehandlung fußt auf dem Experiment von Triemer und Brown (1976), welche die Ultrastruktur der Meiose in Chlamydomonas reinhardii untersuchten. Die Fixierung der Zygoten gelang ihnen erst nach einer Vorbehandlung der Zellwand mit einer 0,3%-igen Trypsinlösung für eine Minute bei Raumtemperatur. Dies soll zu einer Permeabilitätserhöhung der Zygotenwand geführt haben. Der Effekt kann nur dadurch zustande gekommen sein, daß das Trypsin als Protease einen bestimmten Proteinanteil aus der GpP-Fraktion der Zellwand herausgelöst und damit für eine Porosität gesorgt hat. Das Nachvollziehen dieser Vorschrift war zwar erfolglos (Wolf, persönl. Mitteilung), es

schien aber vielversprechend, in eigenen Reihenversuchen die idealen Reaktionsbedingungen für die Trypsinbehandlung zu ermitteln (siehe Tab.1 / 2, Seite 13). Durch Kombination beider Vorbehandlungsmethoden in Form der enzymatischen Behandlung einer geschüttelten Zygotensuspension sollte sich möglicherweise eine additive Wirkung erzielen lassen, die die jeweiligen Einzeleffekte der beiden Maßnahmen noch übertrifft (siehe Tab.1 / 4, Seite 13).

Zur nachgeschalteten Fixierung wurden neben verschiedenen GA-OS-Doppelfixierungen auch die Gerbsäurefixation, die Cocktailfixierung und Kaliumpermanganat herangezogen.

Kaliumpermanganat wurde in den Untersuchungen von Arnold et al. (1972), Osafune (1973) und Osafune et al. (1972, 1975, 1976) eingesetzt wegen seiner die Auswertung von Schnittserien ungemein erleichternden Eigenschaft, alle Membranen deutlich hervortreten zu lassen. Allerdings kommt dieser Kontrast erst dadurch zustande, daß Kaliumpermanganat die cytoplasmatische Matrix, die Ribosomen und auch die Filament-Strukturen überhaupt nicht stabilisiert. Der Gesamterhaltungszustand der Zellen ist eigentlich sehr schlecht. Man sollte eher von einer selektiven Extraktion denn von Fixierung sprechen (Hayat, 1970). Dieses zerstörerische Fixans wurde aber in einem orientierenden Versuch trotzdem in der Absicht eingesetzt, die bisher im dichtgepackten Zygotencytoplasma kaum erkennbaren Mitochondrien einmal der Beobachtung zu erschließen, um sich einen groben Eindruck über ihre Verteilung innerhalb der Zygote zu verschaffen. Die Gefahr übermäßiger Extraktion schien vermindert, da das Kaliumpermanganat auf die GA-Fixierung erst als Nachfixans folgen sollte.

Die Cocktailfixierung erwies sich bei Franke et al. (1969) hinsichtlich der Strukturerhaltung bei einigen Algenzellen der üblichen GA-OS-Fixierungsabfolge überlegen. Das OS soll die Permeabilität für GA erhöhen, die durch GA bekannterweise verursachten Schrumpfungen sollen durch das parallel eingeschleuste OS antagonisiert werden, was sich besonders bei den osmotisch sehr labilen Mitochondrien bewährt hat (Trump und Bulger, 1966).

Die Vorbehandlungen wurden gründlich ausgetestet. Hierbei wurde das Trypsin bei Raumtemperatur und bei 37°C erprobt. Es wurde in 0,3- oder 0,4%-iger Konzentration mit Reaktionszeiten von 1-15

Minuten, nach Schütteln oder ohne Schütteln eingesetzt in der Absicht, einen Hinweis auf die optimalen Versuchsbedingungen zu erhalten. Es soll hier nicht auf jeden fehlgeschlagenen Versuch eingegangen werden, doch sind zusammenfassend als Negativergebnisse festzuhalten (vgl. Abb. 13-25):

- # Es gelang nicht, systematisch die optimale Trypsinbehandlung zu finden. Änderungen der Parameter Enzymkonzentration oder Einwirkungsdauer waren nicht mit Verbesserungen bzw. Verschlechterungen in der Strukturerhaltungsqualität korrelierbar.
- # Das Schütteln veränderte die Zygotenwandmorphologie nicht sichtbar. In der groben Zellsuspension sind die Zygoten noch immer in die Häutchenmatrix eingebettet (Abb. 22-25). Anstelle der zusammenhängenden Kahmhaut liefern nun kleine Hautfetzen, in denen die Zygoten nach herkömmlichem Muster gepackt sind, das biologische Material.
- # Das Schütteln alleine hat keinen Einfluß auf die Fixierungsqualität.
- # Präparationen mit Collidinpuffer zeigen sich stärker extrahiert als solche mit HEPES-Puffer.
- # In fast allen Versuchen manifestieren sich beträchtliche osmotische Schäden in Form von Schrumpfung des Zellkernes und unnatürlichen Aufblähungen der Mitochondrien (Abb. 13-18).
- # Sogar die als unempfindlicher geltenden Strukturen von Plastide und Pyrenoid sind in Mitleidenschaft gezogen worden (Abb. 13-18).
- # Die Mitochondrien bleiben weiterhin schwer identifizierbar. Besonders die Abbildungen 13 und 14 liefern kaum Hinweise auf die Lokalisation der Organelle.
- # Bei Einsatz der Cocktailfixierung können besonders augenfällige Mitochondrienschwellungen beobachtet werden. Ihre Matrix ist dann vollkommen extrahiert und die Cristae sind in die Organellenperipherie gedrängt (Abb. 15).

Gerade anhand der ansonsten unbrauchbaren Kaliumpermanganatfixierung läßt sich demonstrieren, wie unzureichend der GA in die Zygoten eindringt und die Strukturen als Erstfixans vor späterer Extraktion schützt (Abb. 17, 18). Andererseits beweist hier aber der ausgeprägte Kontrast, daß das Kaliumper-

manganat die Zygotenwandbarriere in der verfügbaren Zeit in ausreichendem Maße überwinden konnte.

Mit einer Verbesserung der Strukturerhaltungsqualität korrelierbar war die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C bei der Trypsinvorbehandlung. Sowohl beim Zygotenhäutchen (Abb. 19-21), als auch nach Schütteln (Abb.22-24) konnte dies aufgrund des besseren Allgemeinerhaltungszustandes der Zellen festgestellt werden. In beiden Fällen wurde eine 2%-ige Trypsinlösung zwei Minuten lang einwirken gelassen, bevor die GA-OS-Doppelfixierung (jeweils 2% / 2 Stunden) zum Einsatz kam. Andere Fixantienabfolgen brachten keinen zusätzlichen Vorteil.

Während sich die Triemer'sche Vorschrift als unbrauchbar erwies, scheint die Trypsinbehandlung bei 37°C, der eigentlichen Arbeitstemperatur des Enzyms im Säugetierorganismus, doch für eine leichte Erhöhung der Zellwandpermeabilität zu sorgen, wie das optisch bessere Erscheinungsbild der Zygoten in den Abbildungen 19-21 beweist. Die Cytoplasmamatrix ist zwar relativ grobkörnig, konnte aber zumindest vor Extraktion geschützt werden. Plastide und Pyrenoid zeigen sich durchweg gut erhalten, während der Kern und vereinzelt auch der Protoplast Zeichen von Schrumpfung aufweisen. Alle Zygoten (siehe hierzu besonders Abb.21) enthalten mehrere runde kompakte Körper, die nicht von einer Membran umgeben und regellos in der Zelle verteilt sind. Bei diesen Inkrustierungen handelt es sich möglicherweise um unlösliches nicht sezerniertes Zellwand-Material, denn auch Cavalier-Smith (1976) beschrieb dichte granaförmige Körper, die er für Präkursormaterial der inneren Zygotenwandschicht hält und die in ihrer Größe von 1-2 µm den hier beobachteten Einschlüssen entsprechen.

Bei der Beurteilung der Mitochondrienfixierung ist jetzt dank der einigermaßen kompakt erhaltenen Organellenmatrix eine bessere Verfolgung der Lokalisation der Mitochondrienanschnitte gegeben. Es darf aber nicht außer Acht gelassen werden, daß sehr viele dieser Profile über starke punktuelle Schäden, möglicherweise herrührend von unnatürlich aufgeblähten Cristae, verfügen (Abb.21). Zudem ist die Feinstruktur der Organelle, z.B. deren exakte Umrisse oder die genaue Anordnung der Cristae, nicht eindeutig zu verfolgen.

Auch die Kombination der beiden Vorbehandlungen kann als Ergebnis ein erleichtertes Erkennen der Mitochondrienanschnitte vorweisen (Abb.22-25). Dabei ist die verbesserte Fixierungsqualität wohl kaum auf das für sich alleine wirkungslose Schütteln (siehe Seite 35), sondern eher auf die Trypsinbehandlung zurückzuführen, die hier ebenfalls bei 37°C durchgeführt wurde.

Auffallenderweise zeigte aber ein Teil der so präparierten Zygoten eine ungewöhnliche Innenarchitektur. Die in Abbildung 22 dargestellte Zelle besitzt mit der Plastide, die wie ein Gürtel fast die gesamte Zygotenperipherie ausfüllt, mit den geordneten und regelmäßig verlaufenden Thylakoidmembranen, mit einem annähernd zentral lokalisierten Kern und mit einem Karyoplasma, in dem neben wenig kondensiertem Material ein markanter Nukleolus dominiert, den üblichen inneren Aufbau, der schon in den bisher vorgestellten Zygoten anzutreffen war. Er sollte später anhand von optimal fixierten Zellen vor allem für die Kernkonfiguration noch einmal Bestätigung finden (vgl. Abb.36,37,39).

Von diesem für das Cytoplasma der reifen Zygote typischen Aufbau weichen die Zellen der Abbildungen 23-25 deutlich ab: Die Thylakoide zeigen sich verknäuelt, die gesamte Plastide wirkt aufgedunsen und beansprucht in Medianschnitten fast den gesamten Zellinnenraum. Der Platz für den relativ kleinen Zellkern und die meisten der Mitochondrien wird dadurch auf ein schmales Segment in der Peripherie des Cytoplasmas eingeengt. Die Mitochondrien sind fast alle kreisrund und haben ihre natürliche Formenvielfalt verloren. Ebenfalls in der Zellperipherie ist ein unverhältnismäßig großes kompaktes rundliches Gebilde anzutreffen. Dieser Körper kann sogar die Dimensionen des Zellkernes übertreffen (Abb.24,25). In geschüttelten Zygoten war jeweils nur ein solch riesiger Körper zu finden, während anders präparierte Zellen (Abb.12,15,19 und vor allem 21) kleinere Einschlüsse dieser Art in größerer Anzahl vorwiesen. Abweichend vom Normalzustand verfügt das Karyoplasma dieser Zygoten über reichlich und deutlich kondensierte Strukturen, die Chromatin, Kernkörperchen oder sonstige Zerfallsprodukte des Nukleolus darstellen können.

4.1.1.3) Fixantien mit hohem Penetrationsvermögen

Als gut penetrierende und daher für die Präparation dickwandiger pflanzlicher Zellen besonders geeignete Fixantien werden

in der Literatur Formaldehyd und Acrolein empfohlen (Feder und O'Brien, 1968; Mersey und McCully, 1978). In einer Studie an Tomatenhaarzellen mit dicker Kutikula als Modell für schwer penetrierbare Pflanzenzellen wurden der Fixationsverlauf und die Fixationsgeschwindigkeit untersucht. Aufgrund seiner niedrigen Fixationsgeschwindigkeit provozierte das Formaldehyd noch 30 Minuten nach Fixierungsbeginn "tanzende" Mitochondrienbewegungen und Ortsverschiebungen dieser Organelle im Cytoplasma (Mersey und McCully, 1978). Sein Einsatz für die hier geplanten Untersuchungen an Mitochondrien kann daher nicht in Erwägung gezogen werden. Das Acrolein dagegen, welches nicht nur sehr gut penetriert, sondern auch rasch fixiert, brachte in der zitierten Studie sämtliche cytoplasmatischen Strömungen in wenigen Minuten zum Stillstand, wobei die Mitochondrienstruktur den Beobachtungen der Autoren zufolge gut erhalten blieb. Eine Mischung aus GA und Acrolein war dem Acrolein alleine noch weiter überlegen.

Es lag also nahe, sich die an einem vergleichbaren Objekt erworbenen Erfahrungen dieser Autoren für die Fixierung der Chlamydomonas-Zygote zunutze zu machen. Ihre Fixierungsrezepte wurden übernommen, als Vehikel diente der für Acrolein empfohlene Sörensen-Phosphatpuffer. Acrolein und die GA / Acrolein-Mischung wurden daneben auch zur Fixierung trypsinbehandelter, geschüttelter, sowie geschüttelter und trypsinbehandelter Zygoten herangezogen (siehe Tab.1 / 5, Seite 13) und die hiermit erreichbare Strukturerhaltung überprüft (Abb.26-28).

Es zeigten sich bei allen Präparationen schwere Schäden sowohl am Protoplasten als auch an den meisten Organellen. Starke Schrumpfungen äußerten sich in Form der von der Zellwandinnenseite losgelösten Cytoplasmamembran und des unregelmäßig konturierten Zellkernes (Abb.26-28). Fast alle Einschlußgebilde waren extrahiert. Trotz OS-Nachfixierung gelang es nicht, die Thylakoidmembranen im herkömmlichen Sinne sichtbar zu machen. Die ganze Plastide erschien als verschmierte Masse und ohne Substrukturen, wobei auch oftmals die Stärkerosette des Pyrenoids in starke Mitleidenschaft gezogen wurde (Abb.27,28). Lediglich die saubere Wiedergabe der Kernhülle als geschwärzte Membran übertraf alle anderen bisherigen Fixierungen. Die Mitochondrien mit ihrer durchwegs dunklen Matrix sind vereinzelt sehr gut zu be-

obachten (Abb.28), doch der überwiegende Teil ihrer Profile hebt sich aus dem Cytoplasma, dem die Protoplastenschrumpfung noch mehr Dichte verleiht, kaum mehr ab. Lediglich die Cristae signalisieren die Lokalisation der zugehörigen Organelle, wobei die Cristaemembranen selbst allerdings selten gut identifizierbar sind.

4.1.2) Versuche zur Kryopräparation mit Kryofixierung (KF) und anschließender Kryosubstitution (KS)

Aufgrund ihrer physikalischen Gesetzmäßigkeiten ist die KF eigentlich in idealer Weise geeignet, diejenigen Objekte in lebensnahem Zustand zu stabilisieren, welche von chemischen Fixantien nur sehr langsam, und dann nur unter Inkaufnahme von Artefakten, durchdrungen werden können. Bei der KF (Übersichten bei Müller, 1979; Sitte, 1980, 1982; Plattner und Bachmann, 1982) handelt es sich um ein rein physikalisches Fixierungsverfahren, bei dem das Objekt durch einen abrupten Temperatursturz von Raumtemperatur auf ca. -180°C augenblicklich eingefroren wird. Die strukturgebenden intrazellularen Komponenten werden durch das schlagartig erstarrte Zellplasma in ihrem in-vivo Zustand festgehalten. Voraussetzung für eine solche Strukturerhaltung sind genügend hohe Abkühlraten, die bewirken, daß das Zellfluid glasartig amorph erstarrt (=Vitrifizierung), oder zutreffender, mikrokristallin unter Bildung von elektronenmikroskopisch nicht mehr störenden, 10-15 nm großen Eiskriställchen einfriert.

Langsames Einfrieren führt zu größeren Eiskristallen, die schnell wachsen. Währenddessen trennt sich die wässerige Phase von den gelösten Stoffen, was Verschiebungen in der Zellkompartimentierung auslöst. Kleinere Zellorganelle, Makromoleküle, Salze, etc. werden an die Peripherie der Eiskristalle gedrängt und dort konzentriert. Kleinere Organelle werden daher unkenntlich gemacht, größere deformiert. Abkühlraten von 10 000 K/sec dagegen resultieren in vitrifiziertem / mikrokristallin eingefrorenem Material, da hierbei mehr Kristallisationswärme abgeführt wird, als produziert werden kann, ein Eiskristallwachstum also nicht möglich ist.

Der mikrokristalline Zustand ist thermodynamisch sehr instabil und hat das Bestreben, bei Temperaturerhöhung in den thermodynamisch stabileren kristallinen Zustand überzugehen. Man spricht von Rekristallisation, die einsetzt, sobald die Temperatur

über die Rekristallisationstemperatur angehoben wird. Für Wasser liegt sie bei -130°C (Pryde und Jones, 1952), in biologischen Objekten sicherlich nicht tiefer als bei -80°C (Sitte, 1982). Bei der KF wird die Wärme der Probe nur durch deren Oberfläche entzogen. An Objekten mit einem hohen Oberflächen / Volumen-Verhältnis sind daher genügend hohe Abkühlraten begünstigt. Ein Stückchen Zygotenhaut mit seiner geringen, zudem steuerbaren Dicke (meist 20 µm; siehe Seite 9), verfügt über solch vorteilhafte geometrische Verhältnisse. Bis zu einer Schichtdicke von 10-12 µm kann eiskristallfrei gefrierfixiert werden (Dempsey und Bullivant, 1976). Die schlechte Wärmeleitfähigkeit der gleich zu Anfang gebildeten Eisschicht verhindert in tieferen Zonen den erforderlichen raschen Wärmeaustausch. Da dem Zygotenhäutchen bei der Immersions-KF von beiden Seiten gleichzeitig Wärme entzogen werden kann, müßte es bei einer Dicke von ca. 20 µm trotzdem zufriedenstellend einzufrieren sein.

Die sich anschließende KS gibt den morphologischen Zustand zum Zeitpunkt des Einfrierens wieder, d.h., die KS ist durch die Qualität der KF limitiert. Die in mikrokristallin kryofixierten Proben lebensnah erhaltenen Ultrastrukturen werden während der KS bei sehr niedrigen Temperaturen durch die langsam und kontinuierlich ablaufende Entwässerung und das gleichzeitige Einschleusen der Fixantien unverändert aufrecht erhalten und stabilisiert.

Angesichts der schlecht permeablen Zygotenwand schien es von großem Vorteil, daß es mit der KS möglich ist, die Zygoten ohne die Gefahr der Artefaktbildung lange im Substitutionsgemisch zu belassen, damit den chemischen Fixantien auch genügend Zeit zur Diffusion durch die Zellwand bleibt. Zu Beginn der Anwärmphase am Ende der KS sollten sich jetzt ausreichend Fixantien im Zellinneren befinden, um bei weiterer Temperaturerhöhung die Strukturen dann endgültig rasch und lebensnah zu stabilisieren.

In der Tat führte die Kryopräparation zu hervorragend fixierten Zygoten mit eindeutig identifizierbaren, für Serienschnitt-Technik und morphometrische Auswertung geeigneten Mitochondrienstrukturen (Brand und Arnold, 1986). Zuvor mußten aber noch stufenweise einige Verbesserungen am Präparationsverfahren vorgenommen

werden, die zunächst hier geschildert und später diskutiert werden sollen.

Bei den ersten Einfrierversuchen wurde sorgfältig darauf geachtet, daß das Häutchen bis zum Einfrieren stets von Medium umgeben war, um ein Austrocknen zu vermeiden. Als repräsentatives Ergebnis kann Abbildung 29 gelten, die eine Zelle zeigt, deren Lumen aufgrund zu langsamen Einfrierens von schwerstem Eiskristallwachstum völlig zerstört ist.

Bei den weiteren Versuchen wurde bis auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm um das Häutchen herum das überschüssige Medium vor dem Einfrieren abgesaugt, um einen innigeren Kontakt zwischen Objekt und Kryogen zu besorgen. Die KS-Dauer im Methanolgemisch betrug 3 bzw. 14 Tage, wobei etwaige Auswirkungen unterschiedlich langen Substituierens festgestellt werden sollten. Als Ergebnis gilt es festzuhalten, daß die Proben neben vielen schlecht eingefrorenen nun auch wenige Zygoten mit deutlich besserem Erhaltungszustand vorwiesen. Innerhalb der intakten Zellwand sind erstmals Strukturen mit Membranen, z.B. Plastidenreste mit Pyrenoid, Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparate, aber weniger Eiskristallschäden zu beobachten. Dieser Fortschritt trat nach beiden Substitutionszeiten zu Tage. Er konnte also nicht vom langen Substituieren herrühren, sondern vielmehr vom Absaugen des überschüssigen Mediums vor dem Einfrieren (Abb. 30a,30b).

Daraufhin wurde überprüft, ob ein völliges Trocknen der Häutchenoberfläche kurz vor dem Kryofixieren doch noch die gewünschte einwandfreie Strukturerhaltung herbeiführen konnte. Die Präparate wurden also nach dem Absaugen zusätzlich an der Luft trocknen gelassen, was nicht mehr als drei Minuten in Anspruch nahm. Nach KF und drei Tagen Substitution im Aceton- bzw. einem Tag im Methanolmedium wurden Zygoten dreier Qualitäten erhalten:

- # schlecht eingefrorene Zygoten mit deutlichen Eiskristallartefakten;
- # zahlreiche Zellen mit wenig Einfrierschäden, aber strukturarmem Intrazellularraum (Abb.32);
- # wenige Zellen mit leicht beschädigter Zellwand und sehr guter cytoplasmatischer Strukturerhaltung (Abb.36-39);

Abbildung 33 zeigt in einer Übersicht den Anteil gut erhaltener Zygoten auf einem Schnitt. Ungefähr 3% der angeschnittenen

Zellen bestachen durch ihre dunkle Matrix und erwiesen sich als einwandfrei gefriersubstituiert. Das Durchmustern von Schnittserien ergab, daß diese Zygoten über ihren gesamten Durchmesser hinweg annähernd gleich gut eingefroren und damit auch komplett für die Serienauswertung zugänglich waren.

Bei Zygoten mit hervorragender Strukturerhaltung enden die Risse, die auch die Häutchenmatrix durchziehen, in der Zellwand. Das Zellinnere ist hier nicht in Mitleidenschaft gezogen. Es treten aber auch oft ausgeprägtere Risse auf, die die Zygoten in Bruchstücke zerlegen, wobei die Bruchfläche nicht selten entlang von Membranen zu verlaufen scheint (Abb.33). Derart schwer geschädigte Zygoten verfügen über ein strukturarmes Cytoplasma . Neben Stärkekörnern und extrahierten Lipidkörpern waren keine weiteren interpretierbaren Strukturen anzutreffen. Das Auftreten solcher Risse wurde in dieser Häufigkeit erst beobachtet, nachdem das Häutchen vor dem Einfrieren äußerlich völlig trocknen gelassen wurde. Diese Zellschäden können daher vom Trocknen, aber durchaus auch vom Durchschütteln der gefrorenen Proben nach dem Transfer in das Substitutionsgemisch herrühren. Das Durchwirbeln am Schüttelgerät versetzt die durch das Einfrieren spröde gewordenen dünnen Häutchen nämlich in so intensive Bewegungen, daß sie beim Aufprall an die Wandung des Probenröhrchens nach Art eines Gefrierbruches in Mitleidenschaft gezogen werden können (siehe Diskussion Seite 78).

Die beiden Substitutionsgemische erbrachten in Bezug auf die Kontrastierung unterschiedliche Ergebnisse. Während sich bei in Methanol substituierten Zellen die Membranen überwiegend im Negativkontrast präsentieren (Abb.34), verfügen acetonsubstituierte Zygoten über den herkömmlichen Positivkontrast (Abb.36-39). Da Letzterer die Untersuchung von Schnittserien erleichtert, wurde bei den nun folgenden Auswertungen ausschließlich auf Zygoten zurückgegriffen, die in Aceton / OS 4% substituiert worden waren. Das unterschiedliche Kontrastergebnis bleibt aber trotzdem zu diskutieren (siehe Seite 81, ff.).

4.2) Ergebnisse zu biologischen Fragestellungen

Die Abklärung der biologischen Problematik der vorliegenden Arbeit befaßt sich im Wesentlichen mit der Beschreibung der wichtigsten strukturgebenden Komponenten der reifen Chlamydo-

monas Zygote und der quantitativen Auswertung der erhaltenen Schnittserien.

4.2.1) Die Ultrastruktur der reifen Zygote

Wie auf Seite 32 bereits besprochen, stellt das Zygotenhäutchen eine heterogene Population dar. In kryopräparierten Proben konnten unter den gut erhaltenen Zellen insgesamt drei Zygoten-Typen unterschieden werden (Abb.35).

- # Nicht runde, sondern bizarr geformte Zellen mit entdifferenziertem, fast schwarzem Cytoplasma (Typ I; Typisierung soll nicht der von Cavalier-Smith (1976) entsprechen!), die den auf Agarplatten gereiften Zygoten sehr ähneln;
- # cytoplasmatisch voll ausdifferenzierte Zellen mit tiefdunkler Matrix (Typ II);
- # Zellen mit voll ausdifferenziertem Cytoplasma und hellerer Matrix (Typ III).

Es ist unklar, ob Typ II eine Übergangsform zwischen Typ I und Typ III darstellt, oder ob die helleren Typ III-Zygoten lediglich präparativ mehr extrahiert wurden. Der Vakuolentyp, der von Cavalier-Smith (1976) beschrieben und auch in der vorliegenden Arbeit nach chemischer Fixierung gefunden wurde, blieb in gefriersubstituierten Häutchen unauffindbar, so daß er möglicherweise einen Fixierungsartefakt darstellt.

Zu der methodisch bedingten Schwärzung der Membranen kann eine dichte, sehr dunkle Zellmatrix nur einen schwachen Kontrast bilden. Dadurch wird das Arbeiten an Schnittserien aber ungemein erschwert, so daß sich die folgenden Untersuchungen überwiegend mit Typ III-Zygoten befassen.

Erfolgreich gefriersubstituierte Zygoten zeigen folgende allgemeine Merkmale: Eine mächtige, in mehrere Schichten untergliederte Zellwand mit feinen Rissen in der äußersten Wandschicht; eine homogene, feindisperse Cytoplasmamatrix mit zahlreichen, überwiegend extrahierten kleinen Vakuolen; sich deutlich abhebende, glatt konturierte Organelle; keinerlei osmotische Schäden am fest der Zellwandinnenseite anliegenden Protoplasten und an den Organellen (vgl. Abb. 36-39).

4.2.1.1) Die Zygotenwand

Wie im späteren Abschnitt 4.2.2.1) noch eingehender ausgeführt, nimmt die Zygotenwand einen beträchtlichen Anteil des Zygoten-

volumens ein. In der Zygotenwand dominieren zwei markante Schichten (Abb.40), eine fibrilläre Schicht ganz außen und eine homogene Schicht, die weiter innen angelegt ist. Dazwischen befinden sich einige unscheinbare Zellwandschichten, die hier Zwischenschichten genannt seien. Die homogene Schicht zeigt sich auffallenderweise in manchen Zellen sehr dunkel (Abb.37, 38), in einigen Zellen dagegen ungefärbt (Abb.36,39), oder sie nimmt, wie bei der Verfolgung von Schnittserien festgestellt werden kann, in ein und derselben Zygote abwechselnd beide Farbgebungen an. Dies rührt daher, daß die elektronendichte homogene Schicht sehr spröde ist und beim Schneiden vereinzelt herausbricht (Gaffal, persönliche Mitteilung). Zellanschnitte mit herausgerissener homogener Schicht lassen an dieser Stelle die Elektronen ungehindert passieren und die Schicht erscheint im Abzug weiß. Auf dem nächsten Schnitt ist die homogene Schicht dann "doppelt" vorhanden und nicht mehr durchstrahlbar. Sie erscheint folglich im Abzug fast schwarz. Bei Schnittpassagen ohne diesen Brucheffekt nimmt die homogene Schicht eine dunkelgraue Farbgebung an.

Während die Außenseite der homogenen Schicht unregelmäßig profiliert ist, verläuft ihre Innenseite absolut glatt. Dort fällt dann nur bei Zygotenanschnitten mit sehr dunkler homogener Wandschicht auf, daß sich zwischen dieser und der Plasmalemma eine schmale, hellere, ebenfalls homogene und ungleichmäßig verlaufende Zygotenwandschicht befindet (Abb.40), die hier innere homogene Schicht genannt sei. Sie färbt sich kaum an und könnte dann fälschlicherweise als Cytoplasmaspalt oder Schrumpfung interpretiert werden.

Die fibrilläre äußerste Wandschicht stellt die Verbindung zwischen der gleichfalls fibrillären Häutchenmatrix und der Zygote her. In ihr sind bei den gut gefriersubstituierten Zellen Haarrissen ähnelnde Schäden zu beobachten, die sich in der Häutchenmatrix fortsetzen, innerhalb der Zellwand aber in den Zwischenschichten vor Erreichen der homogenen Schicht enden.

4.2.1.2) Der Chloroplast

Der becherförmige Chloroplast beansprucht annähernd den gesamten Raum der peripheren Bereiche des Zygotencytoplasmas. Er ist durchsetzt von zahlreichen Stärkegranula mit fast störend starkem Kontrast. Einzelschnitte (Abb.10,11,18) und erst recht das

Durchmustern von Schnittserien beweisen, daß die Plastide der reifen Zygote zwei Pyrenoide enthält. Abbildung 13 zeigt sogar eine Zygote mit der ungewöhnlichen Zahl von drei Pyrenoiden. Damit können Bastia et al. (1969) und Cavalier-Smith (1976) widerlegt werden, die in der reifen in Flüssigkultur gezogenen Zygote nur ein Pyrenoid fanden und deshalb den Abbau eines elterlichen Pyrenoids während der Zygotenreifung annahmen. Ihr Irrtum liegt wohl darin begründet, daß sie nur Einzelschnittuntersuchungen betrieben.

Der Plastidenfeinbau der Zygoten unterscheidet sich von dem der vegetativen Zellen und Gameten. Die in den haploiden Zellen übliche granaähnliche Zusammenfassung mehrerer Thylakoide zu Thylakoidsträngen wird in der Zygote verändert. In Plattenzygoten entdifferenziert die Plastide völlig, Thylakoide sind nicht mehr identifizierbar (Abb. 5,6). Die Plastiden der Häutchenzygoten entdifferenzieren dagegen nur teilweise: Die Thylakoidstränge dissoziieren in einzelne Thylakoide auseinander, so daß die die Stränge separierenden Zwischenräume verschwinden. Wie eine dichte Parallelenschar füllen die Thylakoide nun das gesamte Stroma aus (Abb.41). Dieses geordnete System vieler in annähernd gleichem Abstand angeordneter Membranen scheint empfindlich auf selbst die geringsten Einfrierschäden zu reagieren. Die Stellen, an denen dieses Membransystem ungeordnet erscheint und ungleich weite helle Zwischenräume sichtbar sind (Abb.37,39 *), deuten auf minimale Gefrierschäden hin.

Die beiden Hüllmembranen gefriersubstituierter Chloroplasten liegen ohne Zwischenraum eng aneinander (Abb.41). Das Fehlen des - nach chemischer Fixierung üblichen - elektronentransparenten Spaltes zwischen den Organellenhüllmembranen bei Anwendung der Gefriersubstitution wird anhand der Mitochondrienultrastruktur eingehend besprochen und diskutiert werden (Seite 47,ff., 85,ff.).

4.2.1.3) Der Zellkern

Die Kernanschnitte gefriersubstituierter reifer Zygoten zeichnen sich durch ihr glattes fast kreisrundes Profil aus, was die Abwesenheit von osmotischen Schäden beweist. Meist ist der Kern zentral, nur vereinzelt exzentrisch (Abb.36) innerhalb der Zygote lokalisiert. Das feinkörnige homogene Karyoplasma enthält einen ausgeprägten Nukleolus. Im Nukleolus umschließt ein Gürtel von elektronendichter "Pars granulosa" die elektronentransparentere "Pars fibrosa". Dieser Gürtel wird stellenweise von der "Pars fibrosa" durchbrochen. Diese beiden Nukleoluskomponenten sind von Gaffal und Schneider (1978) an der Zygote von Polytoma beschrieben worden. Abbildung 42 zeigt

mehrere zentrale Anschnitte von Zellkernen gefriersubstituierter Zygoten. Das Karyoplasma aller prämeiotischen Zellkerne enthielt Chromatin in qualitativ / quantitativ unterschiedlichem Ausmaß. In fünf Kernen war es schwach sichtbar bis wenig kondensiert, in einem Zellkern war dagegen deutlich mehr Chromatin bereits stark kondensiert. Dies steht im Gegensatz zu Triemer und Brown (1976), die dem Kern der reifen Interphase-Zygote die Abwesenheit von Heterochromatin bescheinigten.

In zwei von vier Zellkernen wurde je ein rundliches Körperchen (Ø ca. 400 nm) gefunden. Sie ähneln in ihrer Konsistenz der "Pars fibrosa" des Nukleolus und unterscheiden sich vom Chromatin. Ein Körperchen war im Karyoplasma in der Nähe der Kernhülle lokalisiert, das andere in unmittelbarer Nähe des Nukleolus. Das Profil des Nukleolus ist an der Kontaktzone mit dem Körperchen nach innen eingekerbt (Abb.43).

Bemerkenswerterweise verfügt in allen Zygoten nach KF/KS die Kernmembran über wenig Kontrast. Lediglich durch eine offensichtliche Anhäufung von Ribosomen bzw. endoplasmatischem Retikulum entlang der Kernprofile erhält man einen guten Hinweis auf den Verlauf der Kernhülle. In apikalen Kernanschnitten (Abb.38) sind die Konturen des Zellkernes dagegen nur näherungsweise festzulegen.

4.2.1.4) Die Lipidkörper

Das Erscheinungsbild eines Zygotenanschnittes wird maßgeblich von zahlreichen im Cytoplasma verstreuten membranbegrenzten Einschlußgebilden (Ø bis zu 1µm) bestimmt, da sich diese ähnlich wie bei den Stärkegranula in 4.2.1.2) erwähnt, als weiße Kavitäten mit scharfem Kontrast zum dichten Cytoplasma bei der Beurteilung photographischer Abzüge markant in den Vordergrund drängen (Abb.36,37,39). Bei diesen Einschlußgebilden handelt es sich um Lipidkörper, deren lipophiler Inhalt während der KS durch das Aceton extrahiert wurde. Die Lipidkörper werden als typische Struktur für das "schlafende" Zygotenstadium bei Algen (Brown et al., 1968) und bei Pilzen (Ansell und Young, 1983; Fineran und Fineran, 1984) beschrieben. Die Abbildung 44 zeigt deutlich, daß diese präparationsbedingten Kavitäten einmal mit einem durch Osmium intensiv anschwärzbaren Inhalt gefüllt waren, der selten so wie hier noch teilweise erhalten blieb. Er besteht

aber nicht aus einer homogenen Masse, sondern scheint sich aus vielen kugelförmigen Körperchen (Ø ca. 0,1 µm) zusammenzusetzen.

4.2.1.5) Die Mitochondrien

Die Organelle sind mühelos auf den einzelnen Zygotenanschnitten zu erkennen. Damit ist eine Hauptanforderung an die Präparation erfüllt. Auch bei hoher Vergrößerung bestechen die Mitochondrienprofile durch ihren glatten, keineswegs runzeligen Verlauf (Abb.45a-c). Dies zeigt ein Einfrieren ohne elektronenmikroskopisch störendes Eiskristallwachstum an. Die Mitochondrienmatrix ist so kompakt, daß die Organelle deutlich aus dem Cytoplasma hervorstechen und das Erkennen der Cristae oft erschwert ist (Abb.36). Die Form der Mitochondrienanschnitte variiert zwischen kreisrund und langgestreckt (Abb.37,38) und des öfteren können auch Konfigurationen, wie in Abbildung 45 a-c gezeigt, beobachtet werden. Solche Profile sind entweder auf peristaltische Einschnürungen, auf Fusions- oder Teilungsvorgänge zurückzuführen.

Die die Cristae beschreibenden Abschnitte der inneren Membran verlaufen ebenso glatt und einheitlich wie die äußere Begrenzung der Mitochondrien. Ihre in engem Abstand annähernd parallele Anordnung wird über die gesamte sichtbare Länge einer Crista beibehalten und kaum von lokalen Aufblähungen, wie sie bei der konventionellen chemischen Fixierung häufig beobachtet werden können, unterbrochen(Abb.46a).

Vereinzelt waren Cristae ohne Intracristaraum oder mit Übergangsformen zwischen auseinandergewichenen oder eng aneinanderliegenden Cristaemembranen anzutreffen (Abb.47b,c). Es gelang aber nicht, das bei zwei in innigem Kontakt nebeneinanderliegenden Unit-Membranen übliche pentalaminare Membranmuster bei der Untersuchung dieser möglicherweise geschlossenen Cristae-Strukturen zu identifizieren.

Bemerkenswert war die Ultrastruktur der Mitochondrienhülle. Der in chemisch fixierten Mitochondrien üblicherweise zu beobachtende Zwischenraum, der die äußere von der inneren Mitochondrienmembran separiert, fehlt hier. Stattdessen können mit Hilfe stark vergrößerter Detailaufnahmen zwei verschiedene Zustandsbilder beschrieben werden:

In vielen Fällen zeigen die Stellen, wo die von der Mitochondrienhülle ausgehende Einstülpung der inneren Organellenmembran

unter Formung einer Crista kontinuierlich verfolgt werden kann, daß diese Invaginationen nicht von einer klar sichtbaren äußeren Mitochondrienmembran umgeben, sondern nach außen hin lediglich von einem feinkörnigen Belag bedeckt sind (Abb.46). Hier ist die äußere Membran also unvollständig erhalten. Andererseits verfügen viele Mitochondrien über eine sehr dicke und markante äußere Begrenzungslinie (Abb.47a-d) . Ein Dickenvergleich der Cristaemembranen mit dieser Begrenzung ergibt, daß letztere nicht von der vollständig erhalten gebliebenen inneren Mitochondrienmembran alleine gebildet werden kann. Vereinzelt gelingt es an Stellen mit zur Schnittrichtung senkrechtem Verlauf der Mitochondrienhülle, ein fünflagiges Membranmuster aufzulösen (Abb.47). Dies heißt, daß die markanten Mitochondrienhüllen aus den beiden eng aneinanderliegenden äußeren und inneren Membranen bestehen.

In jeder der untersuchten Zygoten wurden Mitochondrien angetroffen, die in ihrem Feinbau deutlich von den übrigen Individuen ihrer Population abwichen. Anstatt der dunklen Matrix verfügen sie über einen ausgebleichten Innenraum und ihre wenigen Cristae waren teilweise angeschwollen. Es handelte sich dabei um durchweg sehr kleine Mitochondrien von rundlicher Gestalt. Ihre glatten Konturen lassen Einfrierartefakte als Ursache für diesen von den übrigen Mitochondrien differierenden Feinbau ausscheiden. Es könnte sich vielmehr um Organelle handeln, die im Abbau begriffen sind (Abb.48a,b,c).

4.2.2) Auswertung der Schnittserien

Zur Auswertung der gefriersubstituierten Chlamydomonas-Zygote standen fünf Schnittserien zur Verfügung. Drei Schnittserien erfaßten eine Zygote jeweils vollständig, wobei eine Serie lückenlos sämtliche Schnitte durch die Zelle enthielt. Bei den beiden anderen Serien waren beim Schneiden einige Schnitte verloren gegangen, die hierdurch fehlende Information über die Zellen ließ sich aber problemlos interpolieren. Zwei weitere Schnittserien erfaßten jeweils ca. 60% einer Zygote, und zwar vom Zellanfang bis einschließlich Zellkern. Sie konnten ebenfalls in einige Auswertungen mit einbezogen werden.

4.2.2.1) Die Dimensionen der Zygote

Als heterogene Population unterliegen in Flüssigkultur gezogene Zygoten starken Schwankungen in der Zellgröße. Dies war auch

bei den fünf zur Untersuchung zur Verfügung stehenden Zygoten der Fall. Tabelle 2 macht einige allgemeine Angaben zu diesen Zellen. Es wird die zu deren vollständiger Erfassung nötige Anzahl an Schnitten, der maximale Zelldurchmesser ($Ø_{max}$), das Zell- (V_Z) sowie das Protoplastenvolumen (V_P) genannt.

	Schnitte	$Ø_{max}$(µm)	V_Z(µm³)		V_P(µm³)
Zelle A	99	7,86	215		131
Zelle B	127*	10,46	461		293
Zelle C	112*	8,97	291		171
Zelle D	50(81)**	6,50	143	***	92
Zelle E	67(99)**	8,00	---		---

Tabelle 2: Quantitative Daten zur reifen Zygote, Erklärung siehe Text.

* Diese Werte schließen auch die fehlenden Schnitte mit ein;

** Zahl vor der Klammer = erhaltene Anzahl an Schnitten; Zahl in der Klammer = zur vollständigen Erfassung der Zelle kalkulierte Anzahl an Schnitten;

*** aufgrund der annähernd kugelförmigen Gestalt von Zelle D ist es gut möglich, deren Volumen zu berechnen;

Der maximale Durchmesser der meisten Zygoten liegt unterhalb von 10,0 µm, selten wurden größere Werte beobachtet, sehr oft jedoch kleinere.

Auch die Plattenzygoten, die Cavalier-Smith (1976) und Triemer und Brown (1976) zeigen, überschreiten den Durchmesser von 10,0 µm nicht. Levine und Ebersold (1960) stellten dagegen ein Wachstum der Zygote auf 18-25 µm fest. Möglicherweise erklärt sich die starke Abweichung dadurch, daß die Befunde letzterer Autoren mit dem Lichtmikroskop erarbeitet wurden.

Ein Vergleich des Zell- mit dem Protoplastenvolumen ergibt trotz der zum Teil sehr unterschiedlich geformten Zygotenwände bei allen Zellen einen beträchtlichen ungefähren Anteil der Zellwand von 40% am gesamten Zygotenvolumen (A: 39%, B: 37%, C: 41%). Hierdurch wird die für den Organismus so wichtige Aufgabe der Zygotenwand, nämlich die Abschirmung der Zelle von der Umgebung, eindrucksvoll vor Augen geführt.

4.2.2.2) Quantitative Daten zum Zellkern

Zunächst lediglich zum Zwecke der Datenerhebung wurden auch das Volumen (V_N), der korrigierte Wert für die Oberfläche und

daraus das Oberflächen : Volumen - Verhältnis des Zellkernes ($S_N : V_N$) ermittelt. Diese quantitativen Untersuchungen wurden abgerundet durch die Bestimmungen des relativen Kernvolumens ($V_N\%$), des Nukleolusvolumens (V_{NL}) und des Nukleolusvolumens in Relation zum Kernvolumen ($V_{NL}\%$).

	$V_N(\mu m^3)$	$V_N\%$	$S_N:V_N$	$V_{NL}(\mu m^3)$	$V_{NL}\%$
Zelle A	5,5	4,2	2,8	0,37	6,7
Zelle B	12,8	4,4	2,2	0,75	5,8
Zelle C	8,3	4,8	2,5	0,45	5,4
Zelle D	6,5	ca.7	2,7	0,22	3,4

Tabelle 3: Quantitative Daten zum Zellkern der reifen Zygote; Erklärung siehe Text.

Trotz unterschiedlicher absoluter Volumina entsprechen die relativen Kernvolumina der Zygoten A,B,C einander weitestgehend, während der Kern in Zelle D einen deutlich größeren Volumenanteil einnimmt. Auffallenderweise verfügt dieser Kern auch über wesentlich weniger Nukleolusmaterial.

4.2.2.3) Morphometrische Auswertung des Mitochondrieninventars
Bei allen fünf Schnittserien wurde die Mitochondrienzahl (n_C) bestimmt. Des weiteren wurden für die Zellen A-D das absolute Volumen des Chondrioms (V_C), das relative Mitochondrienvolumen bezogen auf den Protoplasten ($V_C\%$), sowie die Chondriomoberfläche (S_C) ermittelt.

	n_C	D(µm)	$V_C(\mu m^3)$	$V_C\%$	$S_C(\mu m^2)$
Zelle A	46	0,298	1,17	0,89	24,2
Zelle B	75	0,317	2,65	0,90	51,4
Zelle C	75	0,288	1,60	0,88	32,5
Zelle D	21(35)*	0,300	0,68**	1,07**	15,0**
Zelle E	30(45)*	-----	----	----	----

Tabelle 4: Anzahl und Morphometrie der Mitochondrien in der reifen Zygote. Der für die Fehlerkorrektur benötigte mittlere Teilchendurchmesser des Chondrioms ist D. Weitere Erklärungen siehe Text.

* Zahl in Klammern = geschätzte Mitochondriengesamtzahl;
** diese Werte betreffen den tatsächlich erfaßten Teil der Zelle;

Bei der morphometrischen Bestimmung des Mitochondrienvolumens zeigt ein Blick auf die hier einzuführenden Korrekturfaktoren K_o (A: 1,3976, B: 1,3874, C: 1,4159, D: 1,4040), daß ohne Meßwertbereinigung die Mitochondrienvolumina um ca. 40% überschätzt worden wären.

Alle fünf Chondriome setzten sich aus vielen Einzelmitochondrien zusammen. Die Zellen B und C besitzen die gleiche Anzahl an Mitochondrien, während Zelle A und sicherlich auch die leider nur unvollständig auswertbaren Zellen D und E deutlich weniger Organelle vorweisen.

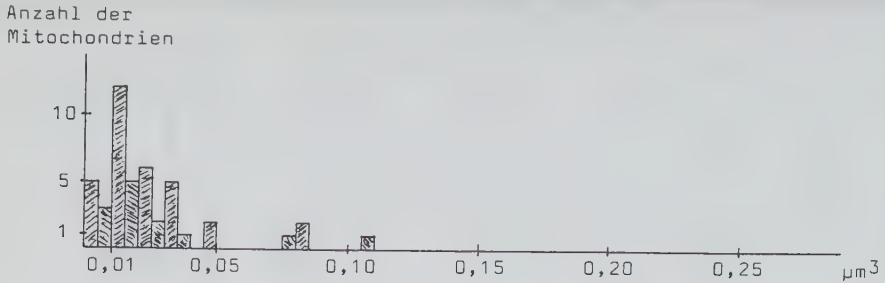
Trotz der unterschiedlichen Mitochondrienanzahl und der verschiedenen absoluten Mitochondrienvolumina verhält sich das Chondriomvolumen direkt proportional zum Zellvolumen, da in den Zygoten A,B,C das relative Mitochondrienvolumen in guter Übereinstimmung bei 0,9% liegt. Der hier etwas höhere Wert in Zygote D kann dadurch zustande gekommen sein, daß aufgrund inhomogener Verteilung der Organelle innerhalb der Zygote das V_C% der nur zu zwei Dritteln analysierten Zelle nicht repräsentativ für die Gesamtzelle ist.

Um festzustellen, wie sich die absoluten Mitochondrienvolumina in einer Zygote quantitativ auf die einzelnen Organelle verteilen, wurden für die Zygoten A-D Säulendiagramme erstellt. Dabei wird ein Chondriom in Volumenfraktionen zerlegt und deren Häufigkeit veranschaulicht (siehe Diagramm 1 der beiden folgenden Seiten).

Als Ergebnis wurden in allen vier Zygoten viele sehr kleine und nur wenige größere Mitochondrien gefunden. Das Vorkommen höher kondensierter netzartiger Organelle kann hiermit bereits ausgeschlossen werden.

Die Volumina der Einzelmitochondrien der Zellen A,B,C sind über die Spanne von 0,003 - 0,303 μm^3 verteilt, wobei Zygote B als größte Zelle auch das größte Einzelmitochondrium beherbergt. Die Volumina der größten Einzelmitochondrien dieser drei Zellen sind entsprechend der Volumina der dazugehörigen Zygoten gestaffelt: B (0,303 μm^3) > C (0,163μm^3) > A (0,107μm^3). Die kleinsten Organelle werden repräsentiert von Individuen mit 0,003 μm^3 (A,C) und 0,005 μm^3 (B).

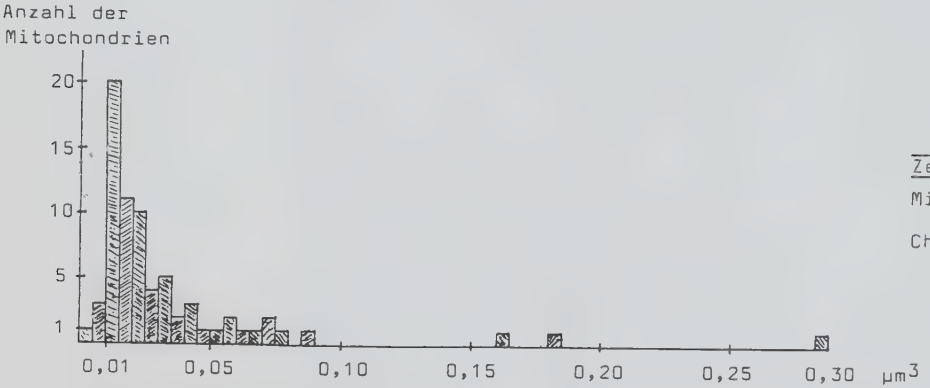
Die mit Abstand am häufigsten gemessene Mitochondriengröße befindet sich bei den Zygoten A,B,C in der Volumenfraktion 0,011-0,015 μm^3. In A sind das 12 von 46 Organellen, was 20% der Mitochondrienpopulation entspricht, in B 20 (=27%) und in C 23 (=30%).



Zelle A

Mitochondrienanzahl: 46

Chondriomvolumen: 1,17 μm^3



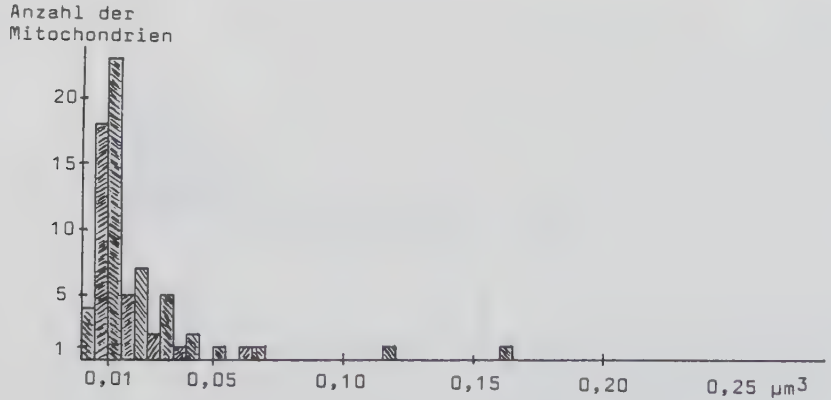
Zelle B

Mitochondrienanzahl: 75

Chondriomvolumen: 2,65 μm^3

Diagramm 1a: Die Mitochondrienpopulation in den Chlamydomonas-Zygoten A und B

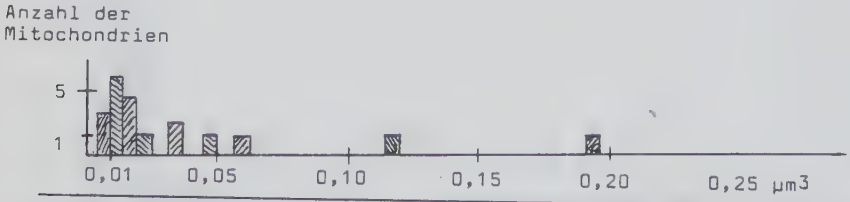
Säulendiagramme der absoluten Organellenvolumina aufgetragen gegen die Organellenzahl



Zelle C

Mitochondrienanzahl: 75

Chondriomvolumen: 1,60 μm^3



Zelle D

ausgewertet: 21 Mitochondrien

kalkuliertes Chondriomvolumen: 1,03 μm^3

Diagramm 1b: Die Mitochondrienpopulation in den Chlamydomonas-Zygoten C und D
Säulendiagramme der absoluten Organellenvolumina aufgetragen gegen die Organellenzahl

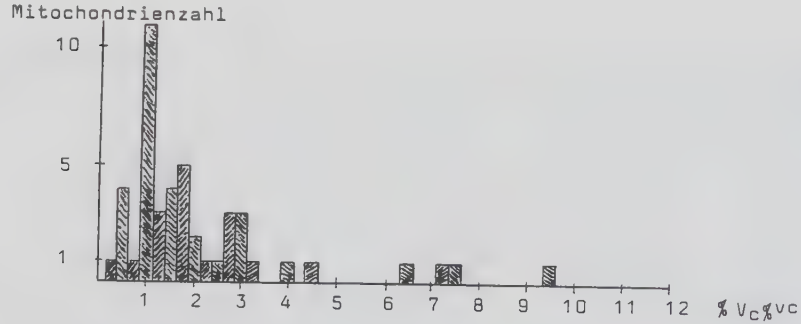
Sehr kleine Mitochondrien dominieren zahlenmäßig in diesen Chondriomen deutlich. Dies veranschaulicht auch der Befund, daß Organelle mit einem Volumen $\leq$ 0,04 μm^3 in den Zellen A und C 90% und in Zelle B 80% des numerischen Mitochondrienbestandes darstellen.

Bei der unvollständig auswertbaren sehr kleinen Zygote D wurden die erhaltenen 21 Mitochondrien ebenfalls aufgelistet. Obwohl diese Zelle beträchtlich kleiner als die Zellen A,B,C ist, fehlen in ihr vermutlich Organelle des in den drei anderen Zygoten vertretenen untersten Volumenbereiches (-0,005μm^3). Die kleinsten Mitochondrien waren hier 0,010 μm^3 groß und lagen damit bereits an der oberen Grenze der nächsthöheren Volumenfraktion (0,006-0,010 μm^3). Verhältnismäßig größer erscheinen in Zygote D auch die Volumina der beiden größten Organelle (0,191 μm^3 und 0,125 μm^3), denn sie übertreffen diejenigen der Zellen A und C.

Zum besseren direkten Vergleich der Mitochondrienpopulationen unterschiedlich großer Chondriome in verschieden großen Zellen bieten sich relative Mitochondrienvolumina an. Es wurde zunächst das absolute Volumen jedes einzelnen Organells zum absoluten Volumen des Chondrioms ins Verhältnis gesetzt. Der resultierende Wert nennt den Anteil jedes Mitochondriums am Volumen des gesamten Bestandes in Prozent ($V_C\%^{VC}$). Säulendiagramme, die sich auf diesen Wert beziehen, erlauben einen objektiven, durch unterschiedliche Größenverhältnisse nicht verzerrbaren Vergleich der Zusammensetzungen von Mitochondrieninventaren. Damit Zygote D unter Vorbehalt in diesen Vergleich mit einbezogen werden konnte, mußte ihr gemessenes V_C (Tab.4, Seite 50) um die nicht analysierten ca. 39% des Protoplasten auf das vermutliche V_C der vollständigen Zelle hochgerechnet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Diagramm 2 auf den beiden folgenden Seiten dargestellt.

Es ist ersichtlich, daß in den Zygoten A,B,C die kleinsten Mitochondrien jeweils von Einheiten repräsentiert werden, die 0,25% des Chondriomvolumens einnehmen (A 1x, B 3x, C 4x). Die nach absolutem Volumen noch deutlich verschiedenen größten Mitochondrien streuen jetzt ziemlich einheitlich um den $V_C\%^{VC}$-Wert 10% (A: 9,5%, B: 12%, C: 10,5%), das heißt, das größte Individuum dieser drei Chondriome ist jeweils ein Organell, welches etwa ein Zehntel des Volumens der gesamten Population besitzt.

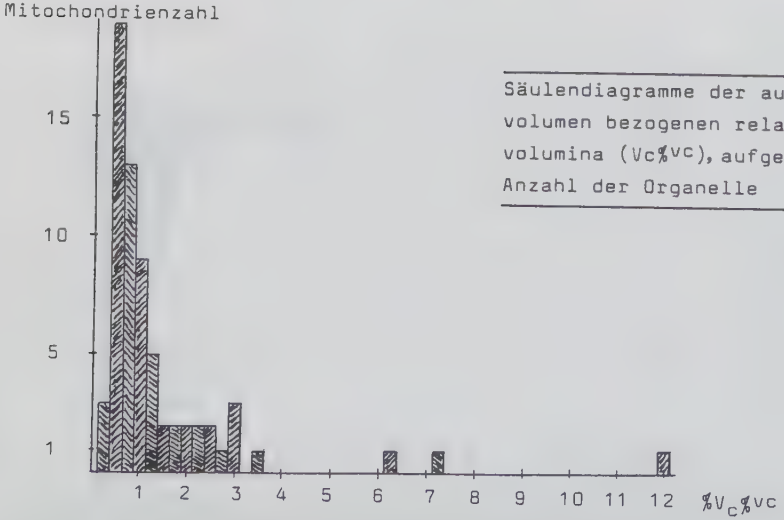
Diese Gemeinsamkeiten hinsichtlich der kleinsten und größten Mitglieder der drei Mitochondrieninventare werden begleitet von



Zelle A

Mitochondrienzahl: 46

Chondriomvolumen: 1,17 μm^3



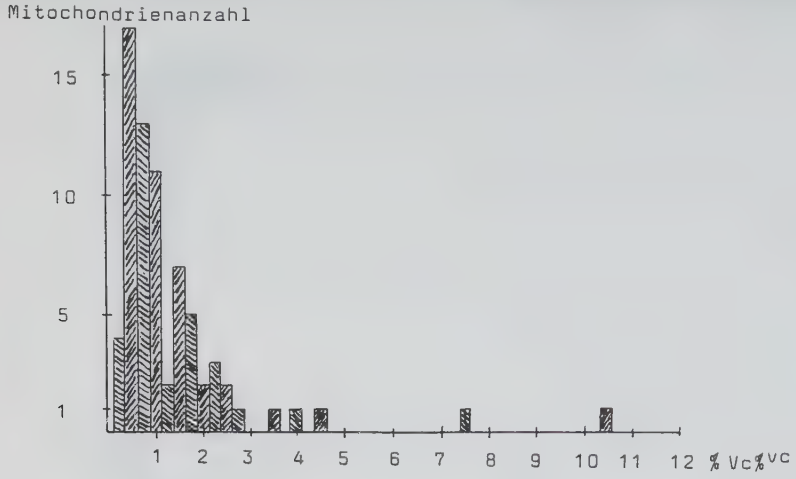
Säulendiagramme der auf das Chondriomvolumen bezogenen relativen Organellenvolumina (Vc%vc), aufgetragen gegen die Anzahl der Organelle

Zelle B

Mitochondrienzahl: 75

Chondriomvolumen: 2,65 μm^3

Diagramm 2a: Der Anteil der einzelnen Mitochondrien am Chondriomvolumen der Zyoten A und B

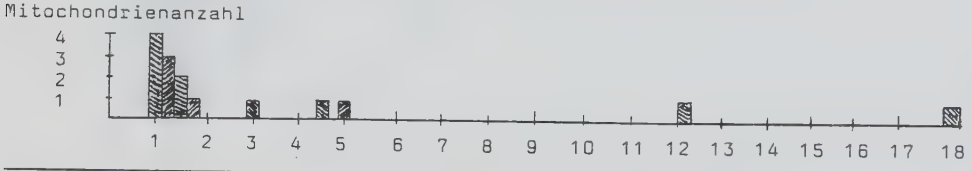


Zelle C

Mitochondrienanzahl: 75

Chondriomvolumen: 1,60 μm^3

Säulendiagramme der auf das Chondriomvolumen bezogenen relativen Organellenvolumina (Vc%vc), aufgetragen gegen die Anzahl der Organelle



Zelle D

21 Mitochondrien ausgewertet

kalkuliertes Chondriomvolumen: 1,03 μm^3

Diagramm 2b: Der Anteil der einzelnen Mitochondrien am Chondriomvolumen der Zygoten C und D

Unterschieden in der quantitativen Zusammensetzung der Bestände. Die am häufigsten vorkommende Komponente in den Chondriomen B und C sind Organelle mit 0,50% des Chondriomvolumens (B 19x = 25% der Population, C 17x = 23% der Population). In Zelle A ist diese Größenfraktion lediglich mit vier Mitochondrien (= 9% der Population) vertreten, während die Größenordnung 1,0% (11x = 24% der Population) deutlich überwiegt (vgl. dieses $V_C\%^{VC}$ bei B: 9x = 12% der Population, bei C: 11x = 15% der Population).

Während in Zygote A nur sechs Mitochondrien (= 13% der Population) über ein $V_C\%^{VC} < 1,0\%$ verfügen, entstammen in den Zygoten B und C die meisten Organelle aus diesem Größenbereich (B 35x = 47% der Population, C 34x = 45% der Population). Hauptgrößenbereich des Mitochondrienbestandes der Zygote A sind Organelle mit einem relativen Mitochondrienvolumen von 1,0 - 1,75%, vertreten durch 23 Individuen, was 50% der Population entspricht. Diese Größenordnung ist in den Zellen B und C vergleichsweise weniger häufig vertreten: B 18x = 24%, C 25x = 33% der Population.

Mitochondrien von nennenswerter Größe sind in den Zellen B und C selten. Von 4% $V_C\%^{VC}$ an aufwärts wurden in B drei und in C vier Organelle gefunden, was 4% bzw. 5% der jeweiligen Population entspricht. Zygote A kann dagegen sechs Mitochondrien aus diesem Größenbereich vorweisen, die 13% ihres numerischen Bestandes darstellen.

Abweichend von A,B,C verfügt die kleine Zygote D über keine Mitochondrien, die das relative Volumen von 1% unterschreiten. Hauptgrößenbereich ist hier, wie in Zygote A, das relative Volumen 1,0 - 1,75%. Zusätzlich zu einem großen Mitochondrium mit $V_C\%^{VC} = 12\%$ wurde in Zygote D auch noch ein mit $V_C\%^{VC} = 18\%$ ein wesentlich größeres Organell gefunden.

Da es sehr unsicher ist, ob das für diese unvollständig auswertbare Zelle lediglich kalkulierbare Chondriomvolumen überhaupt einen vertrauenswürdigen Wert darstellt, schien es ratsam, die soeben herausgearbeiteten Abweichungen bei Zygote D unter Zugrundelegung einer anderen Bezugsgröße mehr abzusichern. Aufgrund des nahezu kugelförmigen Protoplasten kann dessen Gesamtvolumen aus dem unvollständig erfaßten Teilstück gut berechnet werden (Tab.2, Seite 49). Es stellt eine zuverlässigere Bezugsgröße dar als das nur kalkulierbare Chondriomgesamtvolumen und erlaubt daher einen fundierteren Vergleich der analysierten Mitochondrienpopulation D mit denjenigen der anderen Zygoten. Die Säulendiagramme erstellt

auf der Basis der auf das Protoplastenvolumen bezogenen relativen Mitochondrienvolumina $V_c\%^{pr}$ sind umseitig in Diagramm 3 ersichtlich.

Dabei resultierten wegen des wesentlich größeren Bezugsvolumens $V_c\%^{pr}$-Werte, die bis in den Zehntausendstel-Prozentbereich hinunterreichten, z.B. kleinste Mitochondrien A: 0,0020%, B: 0,0017%, C: 0,0018%. Der besseren Übersicht halber wurde die vierte Stelle hinter dem Komma weggerundet und die Achse mit den $V_c\%^{pr}$-Werten lediglich in 0,005%-Schritte unterteilt und dadurch gestaucht. Diagramm 3 ist deshalb gestraffter als Diagramm 2.

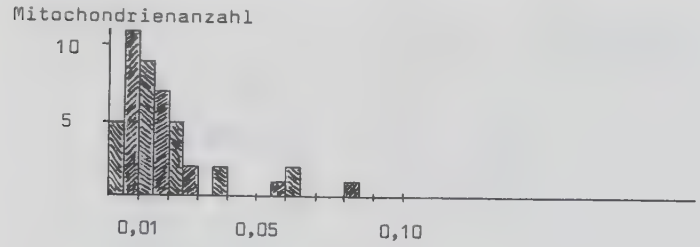
Die Informationen zu den Zygoten A,B,C sind unverändert. In den Zellen B und C dominieren die kleinen und die kleinsten Mitochondrien viel eindeutiger als in Zygote A. In letzterer kann wiederum der Kategorie der mittleren und größeren Organelle ein zweifelsfrei höherer Anteil an der Mitochondrienpopulation zugeordnet werden als in den Zygoten B und C.

Neben dem $V_c\%^{pr}$-Wert für die kleinsten Einzelorganelle (A,B,C = 0,002%, siehe oben) stimmen auch die Werte für das jeweils größte Einzelmitochondrium grob überein: A 0,082%, B 0,100%, C 0,096%.

Als abgesichert kann aber anhand von Diagramm 3 die Zusammensetzung des Mitochondrieninventars in Zygote D gelten. Die beiden größten Individuen übertreffen mit 0,13% und 0,20% $V_c\%^{pr}$ diejenigen der Zellen A,B,C beträchtlich. Vermutlich enthält diese Zygote keine Mitochondrien mit $V_c\%^{pr} < 0{,}010\%$, die in A (16x = 35% der Population), B (46x = 61%) und C (45x = 60%) sehr zahlreich vertreten sind. Ihr Chondriom setzt sich neben den beiden großen aus vielen Organellen mittlerer Größe zusammen.

Für die Schnittserien A - D wurde an allen Mitochondrienprofilen jedes achten Schnittes eine Messung der kurzen und langen Achsen durchgeführt. Daraus wurde für jedes Chondriom der Wert der mittleren kurzen Achse (m.k.A.) und der durchschnittlichen langen Profilachse (l.P.A.) ermittelt.

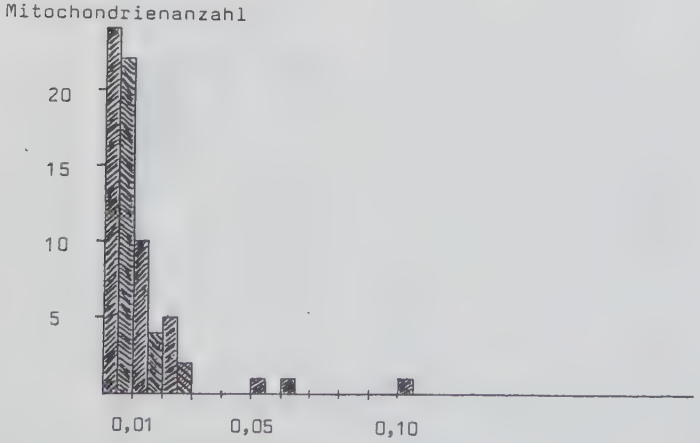
Da die lange Profilachse im Gegensatz zur kurzen Achse abhängig von der Schnittrichtung ist, wurde für jedes Chondriom zusätzlich noch die durchschnittliche Länge in Schnittrichtung (d.L.S.) bestimmt. Sie wird erhalten durch Multiplikation der durchschnittlichen Schnittdicke mit der Schnittzahl, die zur Erfassung eines jeden Organells erforderlich ist, sodann wird der



Zelle A

Protoplastenvolumen: 131 μm^3

Mitochondrienanzahl: 46



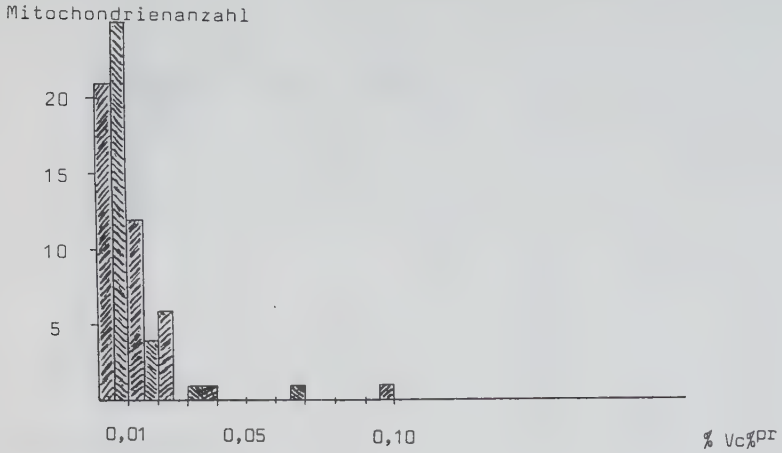
Säulendiagramme der auf das Protoplastenvolumen bezogenen relativen Mitochondrienvolumina (Vc%pr), aufgetragen gegen die Anzahl der Organelle

Zelle B

Protoplastenvolumen: 293 μm^3

Mitochondrienanzahl: 75

Diagramm 3a: Der Anteil der einzelnen Mitochondrien am Protoplastenvolumen der Zygoten A und B



Zelle C

Protoplastenvolumen: 171 μm^3

Mitochondrienanzahl: 75

Säulendiagramme der auf das Protoplastenvolumen bezogenen relativen Mitochondrienvolumina (Vc%pr), aufgetragen gegen die Anzahl der Organelle

Zelle D

berechnetes Protoplastenvolumen: 92 μm^3

21 Mitochondrien ausgewertet

Diagramm 3b: Der Anteil der einzelnen Mitochondrien am Protoplastenvolumen der Zygoten C und D

Durchschnittswert gebildet.

	m.k.A.(µm)	l.P.A.(µm)	d.L.S.(µm)
Zelle A	0,189 ± 0,06 (75x)	0,50 ± 0,31 (65x)	0,51 ± 0,31 (46x)
Zelle B	0,208 ± 0,06 (65x)	0,45 ± 0,31 (71x)	0,58 ± 0,53 (75x)
Zelle C	0,185 ± 0,07 (46x)	0,47 ± 0,25 (41x)	0,44 ± 0,25 (75x)
Zelle D	0,193 ± 0,06 (54x)	0,36 ± 0,20 (47x)	0,70 ± 0,74 (20x)

Tabelle 5: Achsenmessungen am Chondriom der reifen Zygote, Erklärungen siehe Text. Der höhere der beiden Werte für die lange Achse ist unterstrichen.

Die mittleren kurzen Achsen in den vier Zellen sind also um 0,19 µm verstreut. Der Quotient aus langer Achse und kurzer Achse liegt bei allen Chondriomen über 2,0 (A 2,7; B 2,9; C 2,5; D 3,6), was den Schluß zuläßt, daß diese Mitochondrienbestände sich mehr aus länglichen denn aus rundlichen Individuen zusammensetzen.

Wie bereits auf Seite 25 erwähnt, gelang es Gaffal et al. (1982), zwischen dem Oberflächen : Volumen - Verhältnis eines Chondrioms und dessen mittlerer kurzer Achse, eine Beziehung herzuleiten, die es bei Polytoma erlaubte, die Gestalt und Zusammensetzung des Mitochondrienbestandes lediglich unter Zuhilfenahme morphometrischer Daten zu bestimmen. Dies kann den sehr zeitaufwendigen Modellbau überflüssig machen.

	$S/V(\mu m^{-1})$	$\frac{4}{m.k.A.}$	$\frac{6}{m.k.A.}$
Zelle A	20,68	21,16	31,74
Zelle B	19,39	19,23	28,84
Zelle C	20,31	21,62	32,34
Zelle D	22,05	20,72	31,08

Tabelle 6: Versuch der Charakterisierung der Chondriom-Morphologie nach Gaffal et al. (1982), Erklärungen siehe Text.

Obwohl die Gültigkeit dieser Beziehungen für Chlamydomonas wegen der dort gänzlich anderen morphologischen und quantitativen Verhältnisse noch nicht erwiesen ist (Gaffal, persönl. Mitteilung), zeigt Tabelle 6, daß S/V dem Quotienten 4/m.k.A. in allen Fällen weitaus näher kommt als dem Quotienten 6/m.k.A.. Unter der Voraussetzung der Gültigkeit der Beziehungen kann gefolgert

werden, daß die Mitochondrienpopulation der reifen Zygote überwiegend aus länglich-zylindrischen, und weniger aus sphäroiden Organellen besteht. Dieser Befund stünde in Einklang mit der Schlußfolgerung aus Tabelle 5.

4.2.2.4) Modellbau

Von den Chondriomen A und B, sowie von den größten analysierbaren Organellen der Zelle D wurden maßstabsgetreue Modelle gebaut (Abb. 49-51). Sodann wurden an den Modellindividuen Achsenmessungen vorgenommen. Als lange Achse galt die tatsächliche Organellenlänge. Aufgrund der Biegungen und Krümmungen der Mitochondrien wurden diese hierzu durch Anlegen eines Bindfadens der Länge nach abgegriffen. Die erzielte Fadenlänge liefert innerhalb der Genauigkeitsgrenzen des Modellbaus die wahre Mitochondrienlänge.

Anhand von Gestalt und Abmessungen der Modellindividuen konnte der Mitochondrienbestand in vier Kategorien eingeteilt werden:

Kategorie "k": kugelige, ovale ellipsoide Mitochondrien, lange Achse : kurze Achse 2,0
Kategorie "fk": fadenförmig kurze längliche Mitochondrien, 2,0 lange Achse : kurze Achse 5,0
Kategorie "l": langgestreckte Mitochondrien, 5,0 lange Achse : kurze Achse
Kategorie "v": verzweigte Mitochondrien, Organelle besitzen Verzweigungsstellen mit ausgeprägten Verzweigungsästen. Hier sind stets auch die Bedingungen für Kategorie "l" erfüllt.

Nach qualitativer Auflistung der Mitochondrienbestände wurden diese quantifiziert. Die Häufigkeit einer Kategorie innerhalb eines Chondrioms wurde ausgedrückt nach Stückzahl (n), nach ihrem Anteil an der Gesamtstückzahl (n%) und nach ihrem Anteil an der gesamten Chondriommasse (Vc%). Die Ergebnisse nennt Tabelle 7:

Zelle A				Zelle B			
Kategorie	n	n%	Vc%	n	n%	Vc%	Kategorie
k	10	21	9	19	25	10	k
fk	19	41	25	33	44	23	fk
l	16	35	60	16	21	34	l
v	1	2	6	7	9	33	v

Tabelle 7: Die Gestalt der Mitochondrien und der Anteil der einzelnen Mitochondrienformen im Chondriom der reifen Zygote, Erklärungen siehe Text.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß in beiden Zellen die fadenförmig kurzen Mitochondrien stückzahlmäßig die Hauptkategorie darstellen (A 41%, B 44%) und "kleine" Organelle, zu denen die Kategorien "k" und "fk" wohl zusammengefaßt werden können, insgesamt am häufigsten gefunden werden (A 62%, B 69%).

Zygote A verfügt über einen höheren Anteil an langgestreckten und einen geringeren Anteil an verzweigten Mitochondrien, verglichen mit Zygote B. Werden aber die ohnehin oft ähnlich dimensionierten Kategorien "l" und "v" zu "größeren/großen" Mitochondrien zusammengefaßt, dann nivellieren sich diese Unterschiede (A 37 %n, 66 Vc% / B 30 %n, 67 Vc%).

Im Gegensatz zu den Bewertungen nach Stückzahl und numerischem Anteil demonstriert der Vergleich der volumenmäßigen Anteile eindeutig, daß der Hauptteil der Mitochondrienmasse in beiden Chondriomen jedoch nicht von den "kleinen", sondern von den "größeren/großen" Mitochondrien verkörpert wird. Dieser ist in Zygote A in erster Linie in den langgestreckten, in Zygote B in gleichem Ausmaß in den langgestreckten und verzweigten Organellen enthalten. Der Modellbau bestätigt also die morphometrisch erhobenen Befunde von Tabelle 5 und 6, die anzeigten, daß sich die Mitochondrienbestände der reifen Zygote vornehmlich aus zylinderförmig länglichem Organellen zusammensetzen.

Der Modellbau ermöglichte auch die Beobachtung von Einschnürungsstellen an länglichen oder verzweigten Mitochondrien. Dies ist bei der Verfolgung der Mitochondrienprofile innerhalb der Schnittserien nicht immer möglich. In einigen Fällen war der Verbindungssteg zwischen zwei Mitochondrienabschnitten so schmal, daß er beim Modellbau aus Stabilitätsgründen nicht maßstabsgetreu wiedergegeben werden konnte (Abb.52). In Zygote A wurden an neun Mitochondrien elf Einschnürungsstellen gefunden, in Zygote B verfügten sechs Organelle über sieben derartige Einschnürungen.

Oftmals konnten auch separate Mitochondrien in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander gefunden werden, wobei der Abstand der beiden Organelle in etwa der Länge des Verbindungssteges bei manchen der oben erwähnten Einschnürungsstellen entsprach (Abb.53).

Im Zuge der Messung der wahren Mitochondrienlänge wurden auch Informationen erhalten über den Wert des längsten Einzelmitochondriums (l_{max}) in einem Chondriom. Hierbei fanden auch lange

Verzweigungsäste Berücksichtigung, deren Ausdehnung zur Länge des restlichen Organellenkörpers hinzuaddiert wurde. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dargestellt. Zur besseren vergleichenden Einordnung ist der Protoplastendurchmesser (Ø prot) mit angegeben:

	l max (µm)	Ø prot (µm)
Zelle A	4,6; 4,0; 3,7	6,8
Zelle B	8,5; 5,3; 2,9	8,6
Zelle D	5,8; 4,3; 3,2	5,6

Tab. 8: Die größten gemessenen Mitochondrienlängen in den Zygoten A, B und D.

Aus Tabelle 8 wird ersichtlich, daß die größte Organellenlänge in den Zygote B und D annähernd den Wert des Protoplastendurchmessers erreicht, während das längste Mitochondrium in Zygote A einen etwas niedrigeren Wert vorweist.

4.2.2.5) Die topographische Verteilung des Mitochondrieninventars

Neben den bisherigen Befunden zur Gestalt und Zusammensetzung der Mitochondrienbestände muß auch deren Lokalisation innerhalb der Zygote überprüft werden.

Als Lokalisationsmöglichkeit bieten sich zum einen die Zellperipherie, zum anderen die zentraleren Zellregionen an. Als peripher gilt die Zone außerhalb des Plastidengürtels, als zentral der cytoplasmatische Bereich innerhalb der Plastide.

Schnitte durch zentrale Zellbereiche erlauben es, die periphere und die zentrale Zellregion in gleichem Maße zu beobachten und sich so einen ersten groben Überblick über die Topographie der Organelle innerhalb dieses begrenzten Zellabschnittes zu verschaffen.

Die Abbildungen 37 und 39 sind typische Zentralschnitte durch die Chlamydomonas-Zygote. Sie zeigen neben wenig peripher lokalisiertem Mitochondrienmaterial relativ viele Organelle nicht nur innerhalb der Plastide, sondern sogar in unmittelbarer Nähe zum Zellkern.

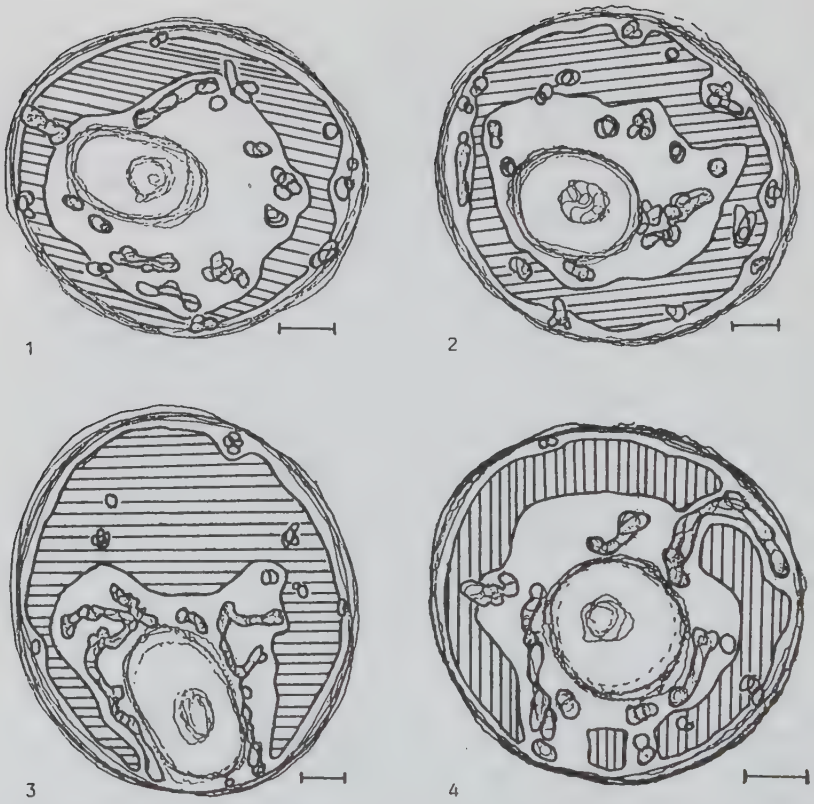
Nun wurden aus einer Schnittserie die ca. 20 innersten Schnitte, die meist auch die Nukleolusregion der Zellkerne mit erfassen, entnommen und paßgerecht übereinandergestapelt. Nach Abzeichnen aller Protoplasten-, Plastiden-, Kern- und Mitochondrienprofile auf ein einziges Stück Transparentpapier erscheint die Mitochondrientopographie innerhalb dieses repräsentativen Zellbereichs anschaulich vor den Augen des Beobachters.

Die umseitigen Skizzen zeigen solche Übersichten von fünf verschiedenen Zygoten. In zwei weiteren Skizzen werden zusätzlich ausgesuchte Zellabschnitte vorgestellt, die die Lage größerer Mitochondrien zu apikalen Kernanschnitten veranschaulichen.

Sowohl periphere als auch zentrale Zellregionen beinhalten Mitochondrien. Manchmal zeigen sich diese gleichmäßig über die Zellanschnitte verteilt (Skizze 1 und 2), während sie in anderen Zygoten ein Übergewicht im zentralen Zellbereich zu haben scheinen (Skizze 3-5). Überraschend hoch ist die Mitochondriendichte in jedem Fall aber in Kernnähe. Jeder der hier dargestellten eigentlich recht kleinen Zellausschnitte verfügt darüberhinaus über Mitochondrien, die sogar in direktem Kontakt mit der Kernhülle zu stehen scheinen.

Leider ist es aufgrund der nur schwach kontrastierten Kern- und äußeren Mitochondrienmembranen nicht möglich, die exakte Lage dieser unmittelbar an der Kernhülle lokalisierten Mitochondrien festzulegen. Beim Studium solcher Situationen in hoher Vergrößerung (Abb.54,55) muß aber zumindest ein inniger Kontakt zwischen Kern und Mitochondrien in Erwägung gezogen werden.

Bei der Untersuchung der Schnittserien wurden alle Mitochondrien, die in deutlich zentralen Zellregionen und in unmittelbarer Kernnähe zu finden waren, protokollarisch festgehalten. Dabei fanden auch einige größere Organelle Berücksichtigung, die sich durch die ganze Zelle erstreckten oder die von der Zellperipherie ins Zellinnere hineinreichten, vorausgesetzt, es bestand abschnittsweise Kontakt mit der Kernregion (z.B. Abb.37). Auf diese Weise konnten die Anzahl (n_K) zentral lokalisierter Mitochondrien, deren Anteil an der Mitochondrienpopulation (%C) und an der gesamten Chondriommasse (%Vc) festgestellt werden. Tabelle 9 zeigt diese Daten:



Übersichtsskizzen aus dem Kernbereich zur näherungsweisen Veranschaulichung der Mitochondrientopographie in der reifen Zygote

Anfertigung siehe Text; vereinzelt täuscht die Darstellung bei in Wirklichkeit separierten Mitochondrien Kontinuität vor.

Die schraffierten Flächen stellen die Plastide dar. Bar = 1 µm;

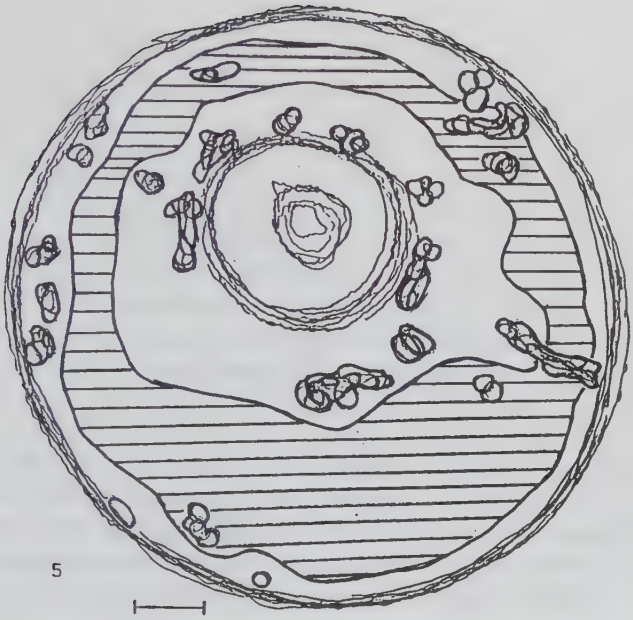
1) Zelle A: 20 aufeinanderfolgende Schnitte;

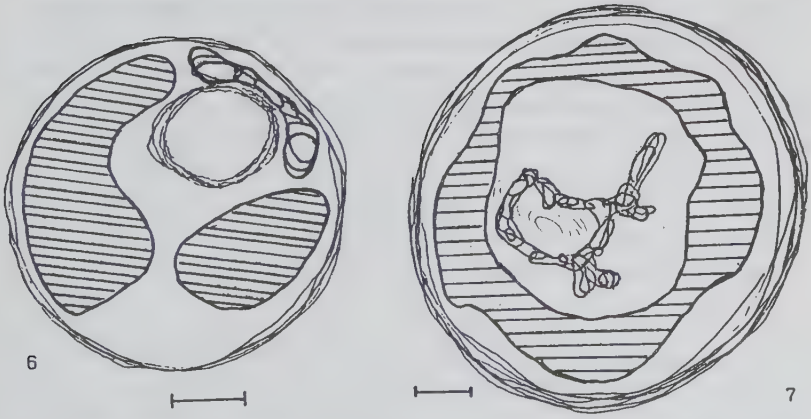
2) Zelle C: 20 aufeinanderfolgende Schnitte;
In beiden Fällen homogene Mitochondrienverteilung, aber auch Kernkontakt!

3) 14 aufeinanderfolgende Schnitte durch eine leider nur in diesem Bereich erhaltene Zygote; zwei kontinuierliche (!) langgestreckte Mitochondrien legen sich wie ein Gürtel um den Kern. Kaum Mitochondrien im kernfernen Raum;

4) Zelle D: 17 aufeinanderfolgende Schnitte; ein Mitochondrium (rechts oben) durchbricht den Plastidengürtel und reicht von der Peripherie bis zum Kern (vgl. auch Abb.37). Es sind mehrere entlang der Kernhülle angeordnete Mitochondrien sichtbar.

5) nächste Seite: Zelle B mit 21 aufeinanderfolgenden Schnitten; hier sind vor allem kleine längliche Mitochondrien entlang der Kernhülle sichtbar. Rechts ein Plastidendurchbruch;





6) Fünf aufeinanderfolgende Schnitte durch eine lediglich in diesem Bereich analysierbare Zygote; ein langgestrecktes Mitochondrium schmiegt sich an die ersten tangentialen Kernanschnitte.

7) 17 aufeinanderfolgende Schnitte durch einen mehr tangentialen Zellbereich von Zygote B zeigen das ringförmige größte Mitochondrium dieser Zelle, welches als Modell auch in Abbildung 56 dargestellt ist. Innerhalb des Ringhohlraumes sind die ersten Kernanschnitte lokalisiert.

Beide Bilder sind Beispiele für die häufige Situation, daß gerade größere Mitochondrien - wenn manchmal auch nur abschnittsweise - in unmittelbarer Kernnähe zu finden sind.

	n_k	%C	%Vc
Zelle A	17	37	40
Zelle B	23	31	50
Zelle C	10	14	40
Zelle D	13	37*	47*

Tabelle 9: Die Mitochondrien in der Zygote mit überwiegend zentraler Lokalisation, Erklärung siehe Text.

* die zugrundeliegende Mitochondriengesamtzahl und das Chondriomvolumen sind nur kalkuliert.

Die Tabelle 9 zeigt besonders bei Heranziehung der Chondriommasse als Bezugsgröße, daß ein beträchtlicher Anteil des Mitochondrienvolumens in zentraleren Regionen der Zygote angetroffen wurde. Nur etwa die Hälfte des Mitochondrieninventares dieser Zellen ist in der Zellperipherie lokalisiert.

Da der numerische Anteil (%C) in diesen Zellen - vor allem ersichtlich bei Zelle C - durchweg niedriger ausfällt, muß es sich bei diesen zentral lokalisierten Mitochondrien um größere Organelle handeln. Die Skizzen 6 und 7 geben zwei Beispiele dafür, daß häufig gerade größere Mitochondrien die unmittelbare Nähe des Zellkerns suchen.

5.) Diskussion

5.1) Die Problematik der Mitochondrienfixierung:

Allgemein und am Beispiel der Chlamydomonas-Zygote Mitochondrien sind keine starren Strukturen. Lebendbeobachtungen veranschaulichen eine zuweilen beachtliche Bewegungsaktivität (z.B.: Leedale und Buetow, 1970; Katz, 1977; Bereiter-Hahn, 1976, 1978; Couchman und Rees, 1982; Bereiter-Hahn und Vöth, 1983; Martz et al., 1984; Bridgman et al., 1986). Diese findet ihren Ausdruck in einem häufigen Wechsel zwischen Vergrößerungs-, Einschnürungs-, Verkleinerungs-, Verzweigungs-, Fusions- und Dissoziationsvorgängen. Die Beweglichkeit der Organelle bleibt dabei nicht nur auf einen Gestalts- und Größenwechsel der Mitochondrien beschränkt, sondern sie manifestiert sich auch in Ortsveränderungen innerhalb der Zelle. Teils durch passive cytoplasmatisch vermittelte Verschiebungen, teils aktiv mit einer Geschwindigkeit von 5 - 30 µm/min kriechend, können sie durch die Zelle wandern. Besonders eindrucksvoll dokumentiert ist diese Morphodynamik der Mitochondrien in den kinematographischen Untersuchungen von Bereiter-Hahn (Bereiter-Hahn und Inst. Wiss. Film, 1982).

Zusätzlich zu dieser natürlichen Formenvielfalt der Mitochondrien manifestieren sich auch experimentelle Eingriffe, z.B. physikalische Veränderungen in der Umgebung, chemische Manipulationen an den Kulturbedingungen oder Induktion verschiedener metabolischer Zustände im zugehörigen Gewebe, in Form von überwiegend unspezifischen Strukturveränderungen der Organelle. Wegen dieser ausgeprägten Sensitivität ihrer Ultrastruktur gelten die Mitochondrien als die empfindlichsten Indikatoren für jegliche Milieuänderung innerhalb und außerhalb der beherbergenden Zelle (Arnold und Gaffal, 1979a; Gaffal und Schneider, 1980b; dort weiterführende Literatur).

Vor dem Hintergrund der Beweglichkeit der Mitochondrien und ihrer überaus hohen Anfälligkeit für unspezifische Strukturveränderungen wird deutlich, daß diese Organelle bei einer Fixierung für elektronenmikroskopische Untersuchungen nur dann in ihrem lebensechten Zustand stabilisiert werden können, wenn die Fixation möglichst schnell erfolgt. Hierfür muß gewährleistet sein, daß die Fixantien rasch, ungehindert und in ausreichender Menge in die Zelle gelangen. Sind die zu untersuchenden Mitochondrien in Zellen mit

einer dicken, schlecht permeablen Zellwand lokalisiert, ist mit Artefakten bei der Mitochondrienfixierung zu rechnen.

Dies trifft zweifelsohne für die Chlamydomonas-Zygote zu. Wie bereits einleitend näher ausgeführt (siehe 1.3., Seite 5), erweist sich die Wand der Chlamydomonas-Zygote gegenüber organischen Lösungsmitteln oder verdünnten Säuren als kaum durchlässig. Weiterhin schützt die Zygotenwand die Zellen vor dem Austrocknen, wenn sie für längere Zeit aus ihrem natürlichen wässerigen Lebensraum entnommen und lediglich in trockener Raumluft aufbewahrt werden.

Gestattet eine solche Zellwand dem Fixans eine Diffusionsrate, die nur so niedrig ist, daß während der gesamten Fixationsperiode zu wenig Agens in die Zelle gelangt, so wird keine oder lediglich eine sehr schwache Stabilisierung aller Zellstrukturen ermöglicht. Spätestens das Hochvakuum im Elektronenmikroskop wird dann eine völlige Zerstörung des zellulären Feinbaus herbeiführen.

Bei höherer Diffusionsrate, aber immer noch zu langsamem Zutritt der Fixantien ins Zellinnere, herrscht dort zur Anfangsphase der Fixierung nur eine geringe Konzentration an chemischen Agentien, die für eine nennenswerte Strukturstabilisierung kaum ausreicht. Während dieser "Latenzzeit" bis zum Anfluten der erforderlichen Fixantienmenge muß man damit rechnen, daß sich die Mitochondrien zunächst weiter bewegen, bevor sie die niedrige, aber kontinuierlich steigende Fixantienkonzentration als toxisches Milieu empfinden. Als Antwort darauf könnten sie dann unspezifische Formveränderungen ausführen oder möglicherweise ultrastrukturelle Schädigung erleiden. Bei Erreichen der für eine vollständige Fixierung ausreichenden Konzentration wäre dann aber der in-vivo Zustand bereits verloren. Während andere weniger empfindliche Zellkomponenten durchaus noch in befriedigender Qualität stabilisiert werden könnten, ist das erhaltene Mitochondrienbild möglicherweise nur noch ein Fixierungsartefakt.

Folglich ist bereits hier anzumerken, daß bei der konventionellen chemischen Fixierung ein langes Belassen der Probe in der Fixierlösung zur Erreichung einer ausreichend hohen Fixantienkonzentration im Zellinneren (siehe Tab.1/1, Seite 13) nur bei weniger labilen Strukturen berechtigt ist. Die hieraus resultierende Qualität der Mitochondrienerhaltung wird aber kaum einen vertrauenswürdigen Charakter besitzen.

Die Fixierung der Mitochondrien der reifen derbwandigen Chlamydomonas-Zygote in möglichst lebensnahem Zustand stellt also ein sehr heikles Problem dar. Bisher dazu veröffentlichte Angaben bestätigen dies: Brown et al. (1968) konnten in der reifen Zygote von Chlamydomonas moewusii keine Mitochondrien beobachten. Sie sahen sich außerstande, zu beurteilen, ob dieses Fehlen der Organelle auf deren tatsächlicher Abwesenheit im ansonsten gut erhaltenen Cytoplasma oder auf ihrer unzulänglichen Fixierung beruht. In seiner ausführlichen Beschreibung der Zygotenultrastruktur bemerkt Cavalier-Smith (1976) bezüglich der Mitochondrien nur, sie seien von "normaler Morphologie". Triemer und Brown (1976) finden in der prämeiotischen Interphase-Zygote "wenige" aber "gut sichtbare" Mitochondrien. Die Begutachtung des beigefügten Bildmaterials zeigte in beiden Arbeiten eine Strukturerhaltung der Mitochondrien, die unseren Belangen offensichtlich nicht genügt. Unsere Untersuchungen erfordern für das Arbeiten an Schnittserien die eindeutige Identifizierbarkeit und die sichere morphometrische Auswertbarkeit möglichst aller Mitochondrienprofile. Zudem sollte die Präparationsmethode eine möglichst lebensnahe artefaktfreie Stabilisierung des Chondrioms gewährleisten.

Für die Chlamydomonas-Zygote war also eine Fixationsmethode zu entwickeln, die folgenden mitochondrienmorphologischen Kriterien zu genügen hatte:

- # Dunkle homogene Mitochondrienmatrix
- # eindeutig erkennbare Mitochondrienumrisse
- # von osmotischen Effekten unbeeinflußte Organellenkonturen
- # gut definierbare Cristae mit möglichst glattem Membranverlauf;

5.2) Die Unzulänglichkeiten in der chemischen Fixierung der Chlamydomonas-Zygote und deren Ursachen

Auf dem Wege der chemischen Fixation ist eine Darstellung der Mitochondrienstruktur, die obigen Kriterien genügt, nur zu erzielen, wenn es gelingt, die Organelle durch das Erstfixans möglichst schnell zu stabilisieren. Dies verhindert die zu wenig permeable Zygotenwand. Spezielle Vorbehandlungen sollten daher deren Barrierewirkung vermindern. Die Ergebnisse zeigen, daß vereinzelt zwar genügend Fixiermittel in die Zygoten eingeschleust werden konnte, um die weniger empfindlichen Strukturen, wie Plastide mit Pyrenoid, Zellkern oder Golgi-Apparat, in durchaus brauchbarer Qualität - sogar ohne Vorbehandlung (Abb.9 - 12) zu erhalten. Auch der

deutliche Kontrast nach der Kaliumpermanganat-Fixierung (Abb. 17,18) kann ohne Diffusion des Reagens durch die Zygotenwand nicht zustande gekommen sein. Es ist aber auch ersichtlich, daß die ausgetesteten Fixationsbedingungen zu unzulänglich waren, um die beweglichen und wesentlich empfindlicheren Mitochondrien artefaktfrei zu stabilisieren.

Egal, ob vorbehandelt wurde, oder nicht, ob Glutaraldehyd, der Cocktail oder Acrolein als Erstfixans eingesetzt wurde, die Mitochondrienultrastruktur genügte in keinem Fall den vorgegebenen Kriterien. Die Organellenkonturen sind nicht eindeutig festzulegen, sei es, weil sich die Organellenmatrix von dem durch Schrumpfung verdichteten Cytoplasma zu wenig abhebt (Abb.10 - 12, 26 - 28), oder weil die die Mitochondrienhülle beschreibenden Membranen nur diffus und unregelmäßig dargestellt sind (Abb.9, 19 - 21). Hierdurch gestaltet sich das für die Auswertungen erforderliche Umfahren der Organellen beim Übertragen der Organellenprofile auf Transparentpapier sehr beschwerlich. Die Entscheidung, ob dann bei eng aneinanderliegenden Mitochondrienanschnitten noch Kontinuität oder bereits Diskontinuität vorliegt, kann in solchen Grenzsituationen nicht getroffen werden. Aber gerade dies wäre eine wichtige Voraussetzung für die in der vorliegenden Arbeit geplante Bestimmung der Mitochondrienzahl. Weiterhin zeigen die Mitochondrienanschnitte zwar oft eine relativ dunkle kompakte Matrix (Abb.9 - 12, 19 - 21, 26 - 28), ihre Cristae können aber nicht als klar von Membranen begrenzte Räume angesprochen werden, sondern als verschwommene helle Flecken.

Die bei einigen Mitochondrienprofilen - besonders gut sichtbar ist dies in Abbildung 20 - anzutreffenden, annähernd isodiametrischen hellen Areale können von unnatürlich aufgeblähten Cristae herrühren. Sie sind möglicherweise aber auch bereits Zeichen eines fortgeschrittenen körnigen Organellenzerfalles, ein Prozeß, der in den lichtmikroskopischen Arbeiten von Roberts (1949) und Manuelidis (1958) als unspezifische Antwort der Mitochondrien auf unterschiedliche zelluläre Schädigungen beschrieben wurde: Nach Abbau der fädigen Mitochondrienformen zu granulären Produkten zeigten sich im Zentrum der Organelle graue Areale, welche sich rasch vergrößerten und weiter aufhellten, bis das Mitochondrium schließlich spontan unter Vesikelbildung zugrunde ging. Die in Abbildung 20 perlschnurartig aneinandergereihten kleinen Kavitäten stellen möglicherweise solche Vesikel dar. Das fixierte

Chondriom ist also wahrscheinlich bereits beträchtlich artefiziell geschädigt.

An mit der Chlamydomonas-Zygote vergleichbaren Tomatenhaarzellen mit dicker Kutikula stellten Mersey und McCully (1978) fest, daß Glutaraldehyd als Erstfixans nicht fähig war, diese Kutikula zu passieren, um die Mitochondrien und ein für diese Zellen als Indikatorstruktur dienendes labiles cytoplasmatisches Vakuolensystem artefaktfrei zu stabilisieren. Die Autoren bescheinigten dem Osmium und vor allem dem Acrolein ein deutlich besseres Penetrationsvermögen. Dies scheint auch für die Chlamydomonas-Zygote zu gelten. Einen Hinweis für ein im Vergleich zum Glutaraldehyd schnelleres Diffundieren des Osmiums liefern möglicherweise die Ergebnisse mit dem in der vorliegenden Arbeit wiederholt als Erstfixans eingesetzten Cocktail-Gemisch: Es führte zu schwererer Mitochondrienschädigung als die reine Glutaraldehyd-Vorfixierung. Die Begrenzungsmembranen der Organelle sind zwar gut erkennbar, aber stellenweise gerissen und sehr unregelmäßig im Verlauf (Abb.16). In noch schlimmeren Fällen ist die Organellenmatrix vollständig extrahiert, die Mitochondrien erscheinen ballonartig aufgebläht und verfügen nur noch in ihrer Peripherie über reduzierte Reste von Cristae (Abb.15). Wahrscheinlich gelangte das Osmium schneller als der Glutaraldehyd in das Zygoteninnere und konnte an den noch ungeschützten Strukturen Effekte ausüben, die von seiner Verwendung als Erstfixans in einigen Fällen bekannt sind. Es kann Schwellungen verursachen (Bahr et al., 1957; Kushida, 1962; Elbers, 1966) und zur Extraktion der von ihm nur unzureichend stabilisierbaren Proteine führen (Bullock, 1963). Die dem gegenüberstehenden Befunde, wonach die Fixierung mit Osmium ein recht lebensnahes Erscheinungsbild der Zellkomponenten erbrachte (Perner und Pfefferkorn, 1953; Ritchie und Hazeltine, 1953; Borysko und Sapranauskas, 1954), wurden an offensichtlich problemlos penetrierbaren Zellen erhalten. Demnach scheint also das Osmium schneller in die Chlamydomonas-Zygote zu diffundieren, aber immer noch nicht schnell genug, um zufriedenstellend zu fixieren. Auch Langenberg (1978), der verschiedene Pflanzenzellen mit dem Cocktail fixierte, berichtete über ein vergleichbares Diffusionsverhalten des Osmiums, welches in einer Ausbildung vesikulärer Artefakte an den Thylakoidmembranen der Plastiden resultierte.

Die an wandlosen Säugerzellen gewonnenen Experimente, die die Motivation für die Verwendung des Cocktails darstellten, nämlich der Ausgleich der nachteiligen Eigenschaften der einen Komponente durch die Effekte der anderen (Trump und Bulger, 1968), sind nicht uneingeschränkt auf pflanzenzelluläre Übertragbar. Da deren Zellwände das gleich schnelle Diffundieren beider fixierten Gegenstandskörper, ist es möglich, daß die ungünstigen Effekte der schneller diffundierenden Komponente überwiegen. Auch wenn das Cocktail-Gemisch bei einigen Algen, wie Bottrydium, Fetzmuskeln (Figge et al., 1968) und Polytoma (Zeffal und Kreutzer, 1977), zu einer hervorragenden Strukturerhaltung führte, so darf doch nicht vergessen werden, daß deren Zellwände eine wesentlich undurchlässigere Diffusionsbarriere darstellen, als die Zytoplasmawand bei Protoplasmaten.

Das bekannt gute Penetrationsvermögen von Acrolein (Trump und Ericsson, 1966; Marsh, und McCully, 1975) reichte ebenfalls nicht aus, um die Zytoplasmadiffusionsbarriere mit der erforderlichen Geschwindigkeit zu überwinden. Auch nach Vorbehandlung konnte keine für die graphische Rekonstruktionen und Morphometrie ausreichende einheitlich gute Strukturerhaltung der Mitochondrien erzielt werden, während der überwiegende Teil der Organellenprofile nicht eindeutig identifizierbar ist und das verwaschene Erscheinungsbild der Cristae-Strukturen Fixierungsartefakte signalisiert, sind nur wenige Mitochondrienquerschnitte mit überwiegend fixierungsbedingt artefakten (Abb.26). Die in vielen Fällen kompakt dunkel erscheinende Organellenmatrix ist wohl eher eine Manifestation der durch die Acrolein-Fixierung verursachten starken Gerinnungen, die an dem stellenweise von der Zytoplasmawand losgelösten Plasmalemma und den unregelmäßig konturierten Zellkernen besonders gut beobachtet werden können. Diese osmotischen Effekte lassen sich möglicherweise mit der relativ hohen Konzentration an Fixantien (gepuffertes Acrolein 5% bzw. Acrolein 2% + Glutaraldehyd 2%). Übereinstimmenderweise ist auch die in den anderen Versuchen oft anschließende Fixierung der Thylakoidmembranen und des Pyrenoidkomplexes hier von sehr schlechter Qualität. Da dieser Befund sowohl ohne, als auch nach Vorbehandlung erhoben werden kann, ist er wohl alleine dem Fixans zuzuschreiben.

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, daß sich vorbehandelte und nicht vorbehandelte Zygoten in Bezug auf die Güte der Mitochondrienstrukturerhaltung nicht wesentlich unterscheiden. Der von Triemer und Brown (1975) als nachher angeschlossene Zygotenwandabbau mit

gleichzeitiger Permeabilitätserhöhung durch Vorbehandlung der Zygoten mit einer Trypsinlösung kann trotz direktem Nachvollzug und umfangreicher Abwandlung der von den Autoren vorgegebenen Reaktionsbedingungen nur als unzureichend für die in der vorliegenden Arbeit zu lösende Fragestellung bezeichnet werden. Sowohl Reihenversuche mit verschiedenen Reaktionszeiten, als auch eine Konzentrationserhöhung dieses hochwirksamen Enzyms um immerhin 33% von 0,3% auf 0,4% (vgl. Abb.13 mit Abb.14) liefern keine Hinweise auf minimale und maximale Reaktionsbedingungen, innerhalb derer die optimalen Verhältnisse für eine Fixation systematisch hätten eingekreist werden können. Allein die Temperaturerhöhung auf 37°C brachte einen leichten, wenn auch nicht ausreichenden Fortschritt (Abb.19 - 21). Gewiß hätten noch höhere Konzentrationen und noch längere Einwirkungszeiten für das Trypsin getestet werden können. Solche gravierenden Eingriffe sind wegen der Empfindlichkeit der Mitochondrienstrukturen auf Veränderungen im umgebenden Milieu jedoch nicht mehr vertretbar.

Unlängst veröffentlichte Untersuchungen liefern die Begründung für die Wirkungslosigkeit dieses Versuchs, die aus Glykoproteinen bestehende Zygotenwand zu lysieren. An Lupinensamen, die Glykoproteine mit 7% Kohlenhydratanteil enthalten, stellten Semino et al. (1985) fest, daß eine Proteolyse mit Trypsin nur wenig Peptide aus den Glykoproteinen freisetzte. Mit steigendem Zuckeranteil der Glykoproteine nahm die proteolytische Aktivität des Trypsins noch weiter ab. Eine vorgeschaltete Behandlung mit Glykosidase zur Entfernung des Großteils der Kohlenhydrate ergab eine beträchtliche Erhöhung der Proteinausbeute bei anschließender Trypsinbehandlung. Hieraus schlossen die Autoren, daß die Proteinkomponente in den Glykoproteinen durch die Zucker vor dem Angriff des Trypsins sterisch abgeschirmt ist. Angesichts des hohen Zuckeranteils von 70% in den Glykoproteinen der Chlamydomonas-Zygotenwand (Catt, 1979) wird die Wirkungslosigkeit der Zellwandlyse als Vorbehandlung verständlich.

Die andere Vorbehandlung des 48-stündigen Schüttelns der Kreuzungssuspension brachte ebenfalls nicht das gewünschte Ergebnis. Es gelang nicht, isolierte und damit für die Fixation freie zugängliche Zygoten zu gewinnen. Auch die Zellwandmorphologie wies keine sichtbaren Veränderungen auf. Infolgedessen war die Mitochondrienstrukturerhaltung sehr schlecht. Diesbezüglich konnte nach zusätzlicher Behandlung geschüttelter Zygoten mit Trypsin bei 37°C

eine Besserung beobachtet werden, die in ihrem Ausmaß derjenigen nach der reinen Trypsinvorbehandlung in etwa entsprach. Das erleichterte Auffinden der meisten Mitochondrienprofile kann aufgrund des schlechten Ergebnisses nach alleinigem Schütteln nur ein Effekt der Trypsinbehandlung sein. Die Fixierungsqualität des Mitochondrieninventars - Abbildung 23 zeigt beispielhaft eine Zygote, die Organellenanschnitte befriedigender und schlechter Strukturerhaltung in enger Nachbarschaft vorweist - ist jedoch zu inhomogen, um graphische Rekonstruktionen und Morphometrie betreiben zu können.

Ein Teil der geschüttelten Zygoten verfügt über eine ungewöhnliche Innenarchitektur (siehe Seite 37), welche vermutlich eine Folge des Schüttelns ist. Gegen einen Trypsineffekt sprechen jedenfalls die Tatsachen, daß solche Strukturbesonderheiten in nicht geschüttelten Zygoten fehlten, und daß aufgrund der Befunde von Semino et al. (1985) das Eindringen des Enzyms in die Zygote zur Auslösung dieser Effekte praktisch ausgeschlossen werden kann.

Glaubwürdiger erscheint es, daß durch das permanente Schütteln während der Zygotendifferenzierungsphase die innere Organisation dieser Zellen mechanisch gestört wurde und ordnende cytoplasmatische Prozesse entgleist sind. Die beständige Rotation hat möglicherweise die Thylakoidanordnung zunächst aufgelockert und dann zerstört, mit der Folge einer Expansion der Plastide über fast den gesamten Zellinnenraum. Dadurch wurden unter Umständen wiederum andere Organelle, wie der Zellkern, die Mitochondrien oder Einschlußgebilde, in ein peripheres Zellsegment verdrängt, so daß deren natürliche Anordnung verloren ging. Das Schütteln könnte auch ein Zusammenfließen der normalerweise in Mehrzahl (Abb.21) anzutreffenden kompakten Einschlußkörper zu einem einzigen sehr großen Gebilde veranlaßt haben. Ein Vergleich des Zellkernes in Abbildung 22 mit denjenigen der Abbildungen 23 - 25 gibt weiterhin aufgrund des in Letzteren wesentlich stärker kondensierten Karyoplasmas begründeten Anlaß zu der Vermutung, daß unterschiedliche Kernstadien vorliegen. Nach Triemer und Brown (1976) und auch nach eigenen Ergebnissen (siehe Seite 46 und Abb.36, 37,39,42,43) verfügt die reife Interphase-Zygote neben dem Nukleolus über gar kein oder deutlich weniger kondensiertes Material in ihrem ansonsten homogenen Karyoplasma. Da die Kernstadien der Abbildungen 23 - 25 offensichtlich nicht denjenigen der prämeiotischen Zygote entsprechen, muß der Schluß gezogen werden, daß das Schütteln in einem Teil der Zellkerne den zeitlichen Ablauf von Differenzierungs-

prozessen gestört hat.

Eine Präparationsmethode kann aber nur dann zu einer lebensnahen zuverlässigen Darstellung des Mitochondrieninventars führen, wenn sie auch die restlichen Strukturen der beherbergenden Zelle in ihrem natürlichen stadienspezifischen Zustand beläßt. Dies ist in Anbetracht der artefiziellen Veränderungen an der Anatomie verschiedener Organelle und deren Lokalisation innerhalb der Zellen nicht gegeben.

Das Scheitern aller Versuche, das Chondriom der Chlamydomonas-Zygote zufriedenstellend chemisch zu fixieren, liegt also wohl immer noch in der zu geringen Durchlässigkeit der Zellwand begründet. Deshalb kann die chemische Fixierung, wie auch Mersey und McCully (1978) für dickwandige Pflanzenzellen konstatieren, "alles andere als augenblicklich" erfolgen. In ihrer Arbeit an dem Basidiomyceten Entorrhiza casparyana bezeichnen Fineran und Fineran (1984) derbwandige Pilz-Zygoten ebenfalls als "notorisch schwer zu fixierende Objekte". Neben derer undurchlässiger komplexer Zellwand führen die Autoren als weitere Hemmnisse den geringen Wasser- und den unverhältnismäßig hohen Lipidgehalt im Cytoplasma der Zygoten an. Diese Lipophilie im Zellinneren würde den Zutritt der wässerigen Fixantien zusätzlich bremsen. Es scheint, dieses Argument trifft auch für die Chlamydomonas-Zygote zu: Ihr Cytoplasma enthält ebenfalls zahlreiche Lipideinschlüsse (siehe Seite 46). Des weiteren folgert Cavalier-Smith (1976) aus dem dichten Cytoplasma, daß die Chlamydomonas-Zygote wesentlich mehr organisches Material, und damit auch Lipide, als wässerige Phase enthält.

5.3) Die grundsätzliche Eignung der Kryopräparation zur Darstellung der Mitochondrienstrukturen in ihrem in-vivo Zustand und eine kritische Beurteilung der Methode am Beispiel der Chlamydomonas-Zygote

Gerade bezüglich der eben genannten, die chemische Fixierung der Zygoten hemmenden Faktoren, bietet die Kryopräparation unbestreitbare Vorteile. Bei der Kryosubstitution dient den Fixantien ein organisches Lösungsmittel als Vehikel, dessen Lipophilie sicherlich den Zutritt in den relativ lipophilen Zygoteninnenraum (s.o.) begünstigt.

Weiterhin ist jegliche Fixierung ein Diffusionsprozeß, sei es, daß ein chemisches Fixans in die Zelle penetrieren muß, oder daß einer Zelle bei ihrer Kryofixierung von außen nach innen Wärme entzogen

wird. Entscheidend für die naturgetreue Stabilisierung der Strukturen ist dabei vor allem die Geschwindigkeit der Diffusion. Diese ist bei der chemischen Fixierung mancher dickwandiger Pflanzenzellen so langsam, daß bis zur Immobilisation der cytoplasmatischen Strömungen selbst bei dem am schnellsten diffundierenden Fixans immer noch eine Zeitspanne von sechs Minuten verstrich (Mersey und McCully, 1978). Dies kann sich in Anbetracht der Beweglichkeit der Mitochondrien bei der Untersuchung schlecht permeabler Zellen fatal auf die Lebensechtheit der dargestellten Organellstrukturen auswirken.

Bei der Kryofixierung dagegen, die aufgrund der schlechten Wärmeleitfähigkeit von Eis allerdings nur innerhalb der äußeren Randzone von 10-12 µm (Dempsey und Bullivant, 1976) für gute Strukturerhaltung sorgen kann, erreicht man mit der schnellen Immersion in ein Kryogen Abkühlraten von 40 000 K/sec, die in einer Schichttiefe von 10 µm gleichbedeutend sind mit einer Einfrierzeit von 0,1 bis 0,6 Millisekunden (Jones, 1984). Diese außergewöhnlich rasche thermische Diffusion kann wohl auch durch keine Zellwandbarriere abgebremst werden.

Gelangen diese überzeugenden Eigenschaften auch voll am biologischen Objekt zum Tragen, dann ist die Kryofixierung aufgrund des augenblicklichen Erstarrens der Strukturen geeignet, diese in ihrem in-vivo Zustand darzustellen. Im Gegensatz zur konventionellen chemischen Fixierung ist die Kryofixierung theoretisch die ideale Methode, um heikle bewegliche Strukturen wie Mitochondrien innerhalb einer impermeablen Zellwand in möglichst lebensnahem Zustand zu stabilisieren. Damit sollte die hier vorliegende biologische Fragestellung lösbar sein.

Gut eingefrorene Zygoten wurden aber erst erhalten, nachdem das dünne Häutchen, in dem die Zygoten zu einem Pseudo-Gewebe angeordnet sind, vor der Immersions-Kryofixierung kurz an der Luft trocknen gelassen wurde (siehe Seite 41). Das Trocknen von Zellen vor der Fixierung ist normalerweise strikt zu vermeiden, da die Zellstrukturen durch Schrumpfung schwer geschädigt werden können. Bei isolierten Einzellern und bei zellwandlosem tierischem Gewebe trifft dies zweifelsohne zu. Die meisten Zygoten im Häutchen dagegen dürften während dieser kurzen Zeit durch ihre isolierende Zellwand und durch die Häutchenmatrix, in welche die Zygoten eingebettet sind, vor einem Austrocknen geschützt sein. In der Tat zeigten gut erhaltene Zygo-

ten auch keinerlei Anzeichen einer Schrumpfung. Durch dieses Trocknen wurde aber erreicht, daß sich die optimal mikrokristallin einfrierbare Zone nicht in dem das Häutchen umgebenden Flüssigkeitsfilm erschöpft, dessen Dicke nicht unterschätzt werden sollte, sondern hauptsächlich auf das Häutchen mit den Zellen erstreckte. Da es aufgrund des beidseitigen Wärmeentzuges aus dem dünnen Häutchen mit der Immersions-Kryofixierung gelang, ganze Zygoten in annähernd homogener Qualität ohne störende Eiskristallartefakte einzufrieren, beschreibt die vorliegende Arbeit erstmals Serienschnitt-Untersuchungen an gefriersubstituierten Zellen.

Zu klären bleibt noch die Ursache für die mit 3% gut gefriersubstituierter Zygoten doch recht niedrige Ausbeute bei der Kryopräparation. Unbestritten hat das Trocknen für eine Erweiterung der vitrifizierbaren Zone im Häutchen gesorgt. Es ist möglich, daß die Tuschefeder als Objekthalter (Abb.4) während der Immersion aufgrund ihres doch recht massiven Charakters zu viel Kryogenkapazität beansprucht, so daß nur noch wenigen Zygoten ausreichend schnell Wärme entzogen werden kann. Hier sollte vielleicht nach einer Lösung gesucht werden, die diesen Effekt minimiert.

Welche Rolle aber die Risse in der Zygotenwand (Abb.40) und in diesem Zusammenhang die Kryosubstitution spielen, ist vorläufig noch unklar. Abbildung 31 zeigt eine Zygote mit ausgeprägterer Wandbeschädigung und Strukturen, die gerade in dem Augenblick des cytoplasmatischen Erstarrens aus der Zelle auszulaufen beginnen. Der Schaden ist also noch vor dem Einfrieren und vermutlich als Folge des Trocknens entstanden. Der Flüssigkeitsverlust, der ja zunächst nur die Häutchenmatrix erfaßt, könnte nämlich innerhalb des Zygotengefüges für Zugspannungen sorgen, die dann solche Zellwandschäden provozieren. Das Risiko des Trocknens besteht folglich darin, die Ausbeute an gut gefriersubstituierten Zygoten durch ein solches Auslaufen der Zellen aufgrund gravierender Zellwandschäden noch weiter zu erniedrigen. Es ist auch möglich, daß durch das Trocknen im Häutchen Sollbruchstellen gelegt werden, an denen entlang sich beim auf Seite 42 erwähnten Schütteln besonders starke Risse ausbilden, die sogar bereits gefrorene Zellen auseinanderbrechen. Das Inset der Abbildung 33 könnte solch eine Situation zeigen: Neben einer hervorragend gefriersubstituierten Zygote, also in einer Zone optimalen Einfrierens, wird eine mehrfach gebrochene Zelle mit denkbar schlechter Strukturerhaltung gefunden. Wäre diese Zygote

erst im kryofixierten Zustand beschädigt worden, dann müßte sie eigentlich über mehr Cytoplasmamatrix verfügen und eine bessere Strukturerhaltung vorweisen.

Solange die Zellwandschäden das Zellinnere aber nicht erfassen, werden sie die anschließende Kryosubstitution begünstigen. Trotz der deutlich längeren Verweilzeit von mehreren Tagen im Substitutionsgemisch wird die Zygotenwand aufgrund der bei -80°C sehr langsam ablaufenden Diffusionsbewegungen bei der Kryosubstitution wohl eine ähnliche Barriere darstellen wie bei der chemischen Fixierung. Durch solche Risse sollten das Substitutionsgemisch und vor allem die darin enthaltenen Fixantien aber ungehinderter in die Zygoten eindringen können. Es überrascht also nicht, daß Zellen mit hervorragender Strukturerhaltung allesamt leichte Zellwandschäden vorweisen.

Vereinzelt wird die Kryosubstitution als die ideale Methode für Objekte bezeichnet, die sich während der konventionellen chemischen Fixierung als schwer penetrierbar erweisen (Steinbrecht, 1980; Haug und Altner, 1984a,b). Es darf aber nicht übersehen werden, daß die dabei angesprochenen Insektensensillen Poren besitzen oder an ihrer abgeschnittenen Antennenbasis frei zugänglich und somit bei genügend langer Dauer problemlos substituierbar sind.

Es ist also zu fragen, ob Zygoten mit intakt gebliebener Zellwand überhaupt erfolgreich substituiert werden können. Das organische Lösungsmittel wird wohl die Zygotenwand bei langer Kryosubstitutionsdauer passieren, der Durchtritt der Fixantien kann jedoch durchaus angezweifelt werden. Ein Austausch des Eises wäre dann zwar möglich, membrangebundene Strukturen würden aber nur so schwach fixiert werden können, daß man sie bei tiefen Temperaturen in Lowicryl^{R} einbetten müßte (Humbel und Müller, 1986). Das in der vorliegenden Arbeit geplante Einbetten bei Raumtemperatur ist für derart schwach fixierte Strukturen in jedem Fall zu aggressiv (Hunzicker und Schenk, 1984).

Zahlreiche Zellanschnitte (Abb.32) verfügen über ein membranloses Cytoplasma. Dieses zeigt jedoch nicht das für schlechtes Einfrieren symptomatische Eiskristallmuster (Abb.29), welches bei einem derart schlechten Gesamterhaltungszustand der Zelle zu erwarten wäre. Eine unzureichende Kryofixierung als alleiniger Grund für die sehr schlech-

te Strukturdarstellung in diesen Zellen scheidet somit wohl aus. Es sollte vielmehr durchaus auch an eine Beteiligung der Kryosubstitution gedacht werden. Sogenannte Eiskristall-Ghosts fehlen nämlich immer dann, wenn das Eis schmilzt, bevor es substituiert werden kann, also bei zu kurzer Substitutionsdauer mit zu schnellem Wiederanwärmen der Probe (Steinbrecht und Müller, 1980). Solch mangelhafte äußere Substitutionsbedingungen sind aber angesichts der in demselben Präparat anzutreffenden Zygoten mit zumindest gut substituierten Eiskristallen auszuschließen. Die Strukturarmut zahlreicher Zygoten liegt also wahrscheinlich eher in einer durch die Zygotenwand behinderten Diffusion der Fixantien während der Substitution begründet. Dadurch waren die Strukturen nur unzureichend für die nachfolgenden Arbeitsschritte geschützt.

Die Schwierigkeiten bezüglich der Interpretation des Erscheinungsbildes der Chlamydomonas-Zygote während der hier durchgeführten Kryopräparation zeigen, daß weitgehend noch methodisches Neuland betreten wurde. Die Kryofixation mit anschließender Kryosubstitution wird bis jetzt noch überwiegend an zellwandlosem tierischem Gewebe und vereinzelt an Bakterien und Pilzen angewandt. Folglich beruhen auch sämtliche theoretischen Erfahrungen, die mittlerweile zu der Methode erarbeitet wurden, aus der Arbeit an diesen Objekten (Übersicht bei Plattner und Bachmann, 1982; Sitte, 1982). Demnach ist die Kryosubstitution eine Präparationsmethode, die auf der Kryofixierung aufbaut, so daß die Qualität der Kryosubstitution unbestreitbar durch die Kryofixierung limitiert ist. Ob optimales Einfrieren aber bereits den Erfolg der gesamten Kryopräparation gewährleistet, und Mängel in der Strukturerhaltung meist ihren Ursprung in einer unzureichenden Kryofixierung haben (Steinbrecht, 1982,1985), scheint als allgemein anerkannte Regel zumindest für das vorliegende Objekt unwahrscheinlich. Es fehlen einfach noch allgemeine Erfahrungen zur Gefriersubstitution grüner zellwandhaltiger Pflanzenzellen für die Transmissionselektronenmikroskopie. Nur wenige Arbeiten haben sich bis jetzt damit befaßt (Hereward und Northcote, 1972; Browning und Gunning, 1977; Tiwari et al., 1984, Brand und Arnold, 1986; Ueda und Noguchi, 1986).

Als Beispiel sei hier die offensichtlich schwer einzufrierende Plastide angeführt. Auf Seite 45 wurde erwähnt, daß selbst optimal kryofixierte Zygoten noch Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Thylakoidmembranen aufweisen, die wohl von minimalen Einfrierschäden

herrühren. In der Literatur gilt aber immer noch der Zellkern als Gradmesser für die Qualität einer Kryofixierung (Steinbrecht, 1980; Bearer und Orci, 1986). Allerdings wurde dieser Befund an tierischen Objekten erhoben, die keine Plastide besitzen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber, daß in Zygoten, deren Chloroplastenstruktur bis auf wenige Membranrudimente bereits völlig zerstört war, durchaus noch befriedigend eingefrorene Zellkerne angetroffen werden konnten (Abb.30a,b). Es ist anzunehmen, daß die Plastiden empfindlicher als andere Organelle auf Einfrierschäden reagieren und ein gesetzter Defekt sich möglicherweise in einer Art Kettenreaktion innerhalb des hochgeordneten Systems der Thylakoidmembranen ausweitet. Auch bei der konventionellen chemischen Fixierung wurde der Thylakoidanordnung bereits eine Indikatorfunktion für die Güte der Strukturerhaltung zugeschrieben (Langenberg, 1978).

Bereits das mikrokristalline Einfrieren von Zellen grüner Pflanzen gestaltet sich durch eine andersartige Charakteristik des Cytoplasmas - je nach Objekt seien hier die Zellgröße, die starke Vakuolisierung, der höhere Wassergehalt, der geringere natürliche Gefrierschutz oder die labile Plastidenstruktur als Beispiel genannt - schwieriger als bei einem sehr kleinen Bakterium, einem wandlosen Lymphocyten oder einer sehr proteinreichen Muskelzelle. Ist dieses Cytoplasma auch noch von einer impermeablen Zellwand umgeben, dann kann zusätzlich auch die Kryosubstitution einer bereits mikrokristallin eingefrorenen Zelle Erfolg und Ausbeute der gesamten Kryopräparation in Frage stellen.

Für zukünftige Untersuchungen gilt es daher, die Ausgangssituation für eine erfolgreiche Kryosubstitution der Chlamydomonas-Zygote zu verbessern. Hierzu könnte, nach Möglichkeit mit weniger Trocknen, eine Automatisierung der in der vorliegenden Arbeit noch manuell ausgeführten Immersions-Kryofixierung beitragen. Damit ist zwar keine weitere Verbesserung der auch im Handbetrieb erreichbaren optimalen Einfrierqualität möglich, wohl aber eine höhere Ausbeute an hervorragend kryofixierten Zellen (Steinbrecht, 1985; Lancelle et al., 1986).

Zu diskutieren ist weiterhin das unterschiedliche Verhalten der Zygoten in den beiden Substitutionsgemischen. In Aceton / Osmium kam der gewohnte Positivkontrast zustande. Die Substitution in dem Medium aus Methanol / Glutaraldehyd / Osmium / Uranylacetat lieferte

dagegen überwiegend Zygoten im Negativkontrast. Diese waren, wie der regelmäßige Verlauf der Thylakoidmembranen belegt, gut eingefroren, so daß die Ursache des Effektes in der Kryosubstitution zu suchen sein müßte. Es liegt nahe hier an einen Extraktionseffekt zu denken. Die lipophile Substitutionslösung könnte die Membranlipide ebenso angegriffen haben, wie die Lipidkörper, deren Extraktion eine unvermeidbare Begleiterscheinung der Kryosubstitution zu sein scheint (Howard und Aist, 1979; Ito und Ichikawa, 1982; Lancelle et al., 1985,1986; vorliegende Arbeit Seite 46).

Zur Extraktionskapazität dieser Lösungsmittel gibt es einige Untersuchungen. Fisher und Housley (1972) an Sojabohnenblättern und Harvey (1981) an Rattenleberzellen berichten über eine geringe Extraktion während der Aceton-Substitution, während Methanol mit 30 - 60% der extrahierbaren Phospholipide und Membranproteine einen deutlich höheren Verlust herbeiführte. Weibull et al. (1983) substituierten Acholeplasma-Bakterien und fanden, daß unterhalb von -70°C die Zellen in Aceton nur 5%, in Methanol dagegen ca. 40% ihres Lipidgehaltes verloren hatten. Trotz der deutlich höheren Extraktion durch Methanol finden die Autoren aber keine wesentlichen Veränderungen in Membranmorphologie und -kontrast.

Gegen eine übermäßige Lipidextraktion während der Substitutionsperiode spricht auch die Tatsache, daß die Polarität lipophiler organischer Lösungsmittel mit sinkender Temperatur zunimmt (Weast et al., 1975-76). Bei -80°C verfügen damit die Solventien über eine im Vergleich zur Raumtemperatur deutlich niedrigere Extraktionskapazität gegenüber Lipiden. Wenn beim Temperaturanstieg die Extraktionsgefahr wieder zunimmt, wird diese durch die gleichfalls ansteigende Fixierungsrate kompensiert.

Auch der Bericht über im Methanolgemisch gefriersubstituierte hervorragend erhaltene Liposomen, deren Präparation nach klassischen Methoden fehlschlug (Müller, 1981), zeigt, daß die Kryosubstitution mit Methanol keine das Erscheinungsbild der Strukturen verändernde Extraktion zur Folge hat. Die membranähnliche Lipidschicht, die bei Liposomen ein inneres wässeriges Kompartiment umschließt, war unverändert als Bilayer dargestellt.

Mag der Aspekt der Lipidextraktion als Ursache für den Negativkontrast vieler methanolsubstituierter Zygoten auch nicht ganz zu vernachlässigen sein, so bietet sich dennoch eine wahrscheinlichere

Erklärung an: Eine geschwärzte, positiv kontrastierte Membran ist eigentlich ein Artefakt. Er wird hervorgerufen von einer Denaturierung der Membranproteine durch chemische Fixantien und Lösungsmittel. Demzufolge kann eine weniger geschwärzte Membran oder ein Negativkontrast auf eine geringfügigere Denaturierung und mehr Lebensechtheit der dargestellten Strukturen hindeuten. Als Beispiele seien Kryoschnitte angeführt, die als die derzeit unverfälschteste Präparationsform Membranen im Negativkontrast zeigen. Für die strukturelle und funktionelle Integrität und damit den in-vivo Zustand eines Proteins ist dessen wässerige Umgebung maßgebend. Vor allem das direkt an das Biopolymer gebundene strukturierte Wasser, das nicht in Eis überzuführen ist und seine Eigenständigkeit verloren hat, ist ausschlaggebend für die Polymerkonformation (Simatos und Turc, 1975; Sjöstrand, 1976). Wird bei der Kryosubstitution einer Zelle neben dem Bulkwasser auch diese primäre Hydrathülle entfernt, so sind die Proteine nicht mehr vor den denaturierenden Effekten der Lösungsmittel und Fixantien geschützt. Sie verlieren ihre natürliche Integrität. Gilt es, Strukturen unter Schonung der primären Hydrathülle kontrolliert zu entwässern, dann ist dies mit der Kryosubstitution bei tiefen Temperaturen möglich (Humbel und Müller, 1986). Die geringe Membranschwärzung der in Methanol substituierten Zygoten weist möglicherweise auf eine solche milde unvollständige Tieftemperaturentwässerung hin (Müller, persönl. Mitteilung).

Gefriersubstituierte Membranen gelten in der Literatur aufgrund ihres glatten gleichmäßigen Verlaufes als überzeugendstes Demonstrationsbeispiel für die Vorzüge dieser Methode. Dies gilt auch für die Chlamydomonas-Zygote. Allerdings fällt auf, daß die glatt verlaufenden Kern- und äußeren Mitochondrienmembranen meist schlecht sichtbar sind. Ein ähnlich schwacher Kontrast oder ein Fehlen der äußeren Mitochondrienmembran wurde auch bemerkt bei Hereward und Northcote (1972), Browning und Gunning (1977), Howard und Aist (1979), Hippe (1985), McKerracher und Heath (1985) und Steinbrecht (1986). Alle Autoren hatten, wie in der vorliegenden Arbeit, mit Aceton / Osmium substituiert und mit Uranylacetat nachkontrastiert. Sie erklären den Effekt als Extraktion durch das Lösungsmittel. Die innere Mitochondrienmembran, die über einen andersartigen und vor allem niedrigeren Lipidanteil verfügt, ist stets klar erkennbar (Abb.46). Weiterhin ist bekannt, daß das Uranylacetat im Substitutionsgemisch die Lipide wesentlich besser stabilisiert als Aceton / Osmium (Knoll, Verkleij, persönl. Mitteilung), so daß das Methanolgemisch mit seinem Anteil an Uranylacetat für eine gut erhaltene

äußere Mitochondrienmembran nach Gefriersubstitution sorgt. Jüngst berichteten aber Lancelle et al. (1986), die Zellen höherer Pflanzen in Aceton / Osmium substituiert hatten, daß Hafniumchlorid, als Blockkontrastmittel nach der Substitution eingesetzt, die kern- und die äußere Mitochondrienmembran gut sichtbar macht. Dies muß nicht bedeuten, daß das Aceton die Membranen doch nicht extraktiv reduziert, sondern es ist zu vermuten, daß das Hafniumchlorid die verbleibenden Lipide besser anfärbt. Für weitere Untersuchungen ist deshalb der probeweise Einsatz dieses Kontrastmittels auch an der Chlamydomonas-Zygote zu empfehlen.

Durch die bisherigen methodischen Betrachtungen am Beispiel der Chlamydomonas-Zygote wird ersichtlich, daß jede Präparationsmethode Unzulänglichkeiten aufweist, die Artefakte mit sich bringen. Da Artefakte durch Strukturveränderungen die Information einer elektronenmikroskopischen Aufnahme verfälschen, seien am Schluß dieser methodischen Betrachtungen die häufigsten Artefaktquellen bzw. die resultierenden Strukturveränderungen bei der chemischen Fixierung (ohne Entwässerung) und bei der Kryofixierung mit anschließender Kryosubstitution angeführt (Rebhuhn, 1972; Gilkey und Staehelin, 1986):

Chemische Fixierung:

- # Unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten einer Fixierlösung;
- # uneinheitliche Immobilisation des Cytoplasmas aufgrund unterschiedlicher Reaktivität der verschiedenartigen Strukturen;
- # Schrumpfung und Schwellung aufgrund osmotischer Belastung während der Präparation;
- # Schäden durch unphysiologische pH-Verhältnisse;
- # Veränderung der Membranpermeabilitäten durch die Fixantien: Umverteilung kleinster Bestandteile im Cytoplasma;
- # lokale Fällungsreaktionen;
- # Vesikelbildung an endoplasmatischem Retikulum und anderen Membranen;
- # Vernetzung verschiedener Strukturen;

Kryofixierung + Kryosubstitution:

- # Teilweises Austrocknen der Zellen während der Probenvorbereitung;
- # Eiskristallartefakte wegen zu langsamen Einfrierens;
- # Rekristallisation durch unzulässiges Erwärmen des bereits

kryofixierten Objektes;
Extraktion durch das organische Lösungsmittel;

Unglücklicherweise werden die meisten Artefakte durch die chemische Fixierung selten als störend bei der Beobachtung empfunden. Vereinzelt wurden sie als Artefakte erst nach Anwendung der Kryopräparation erkannt (Chandler, 1984; Haug und Altner, 1984a,b), nachdem die Strukturen jahrelang falsch interpretiert worden waren.

Die Artefakte bei der Kryopräparation äußern sich dagegen vornehmlich in Form der gut sichtbaren Eiskristallbildung, deren Ursache hinreichend bekannt ist. Auch Lipidextraktion kann meist gut aus den Strukturen gedeutet werden.

Solange die durch eine Fixierungsmethode hervorgerufenen Strukturveränderungen deutlich zu erkennen sind und ihr Entstehungsprozeß leicht verständlich ist, kann noch beurteilt werden, wie die natürlichen Strukturen vor der - artefaktbringenden - Fixierung beschaffen waren. Da Fehlinterpretationen hierdurch vermieden werden können, wird das erhaltene elektronenmikroskopische Bild realistischer (Rebhuhn, 1972; Lancelle et al., 1986). Hier hat die Kryopräparation zweifelsohne Vorteile.

5.4) Die Ultrastruktur der Mitochondrien in der Chlamydomonas-Zygote nach Gefriersubstitution

Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten ein bemerkenswertes Ergebnis bezüglich des Mitochondrienfeinbaus in der reifen Zygote. Die gefriersubstituierten Organelle weisen nicht den nach chemischer Fixierung üblichen elektronentransparenten Spalt zwischen der äußeren und inneren Membran in der Mitochondrienhülle vor. Die Matrix derjenigen Mitochondrien, deren äußere Membran während der Kryosubstitution nicht durch das Aceton extrahiert wurde, war vielmehr von einer dichten Begrenzungslinie umsäumt, die stellenweise einen klaren pentalaminaren Aufbau zeigte (Abb.46a,b; Abb.47a - d). Dieser kann nur dadurch zustande gekommen sein, daß die äußere und innere Mitochondrienmembran als jeweils trilaminare Unit-Membranen durch keinen Spalt getrennt eng nebeneinander liegen. Daraus resultiert ein alternierendes fünflagiges Muster aus drei elektronendichten und zwei elektronentransparenteren Linien. Die mittlere elektronendichte Linie tritt dabei deutlicher hervor, da sie ja den Kontakt der beiden trilaminaren Membranen herstellt (zum besseren Verständnis siehe nachfolgende Skizzen).

Die Cristae, die im untersuchten Objekt anscheinend überwiegend der vesikulären oder lamelliformen Modifikation entsprechen, waren dagegen zumeist als Spalt zu beobachten (Abb.45a - c; Abb.46a,b). Unter der Voraussetzung, daß einige Strukturen nicht schräg geschnitten worden waren, konnten aber auch sehr enge Cristae ohne erkennbaren Spalt oder Übergangsformen zwischen Spalt und eng aneinanderliegenden Cristae-Membranen angetroffen werden (Abb.47b - d).

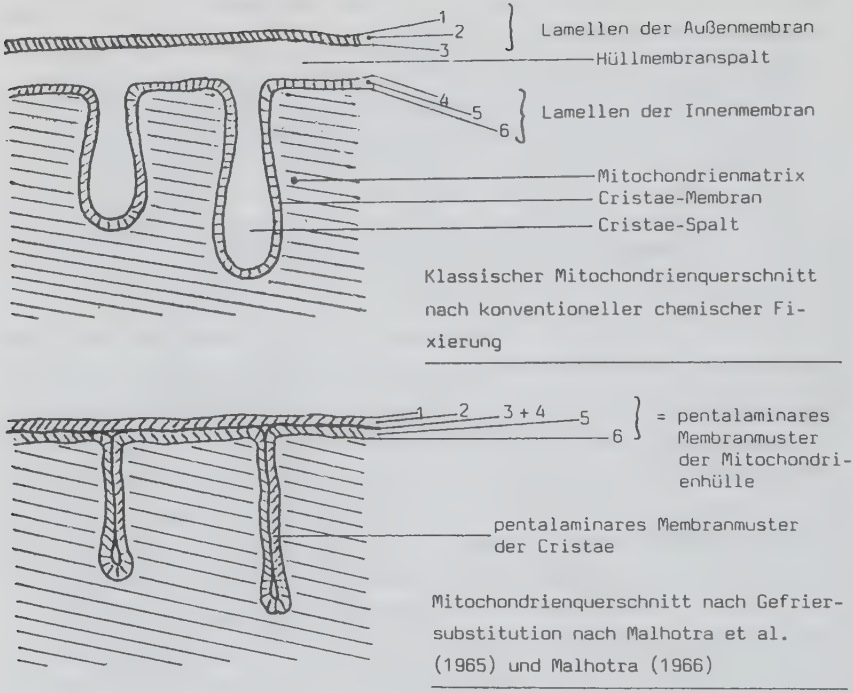
Diese Ergebnisse können durchaus zu der Diskussion über die Abhängigkeit der dargestellten Mitochondrienultrastruktur von der Präparationsmethode beitragen.

Seit Jahrzehnten hat das nach konventioneller chemischer Fixierung erhaltene Mitochondrienbild mit einem 50 - 100 A breiten Spalt sowohl zwischen den Hüll- als auch den Cristae-Membranen Gültigkeit. Die vielfältigen mitochondrialen Funktionen werden auf der Grundlage dieses Strukturmodells erklärt.

Die Arbeiten von Malhotra und Sjöstrand ergaben jedoch Hinweise, daß dieser Spalt einen Artefakt darstellt (Malhotra et al., 1965; Malhotra, 1966; Sjöstrand und Bernhard, 1976). Dieser soll durch die komplexen milieuverändernden Vorgänge während der Osmium-Fixierung zustande kommen (Malhotra, 1966). Die Autoren beobachteten nach der Anwendung von weniger denaturierenden Präparationsmethoden, insbesondere der Kryopräparation oder der reinen milden Aldehyd-Fixierung, ein enges Aneinanderliegen sowohl der äußeren und inneren Membran in der Mitochondrienhülle, als auch der beiden unter Formung einer Crista eingestülpten gegenüberliegenden Abschnitte der inneren Mitochondrienmembran. Im Elektronenmikroskop zeigten sich diese beiden in innigem Kontakt nebeneinanderliegenden Membranen als eine pentalaminare Struktur von 130 A Gesamtdicke (Malhotra, 1966).

Malhotra machte nähere Angaben, wann die Mitochondrienmembranen als geschlossenes pentalaminares und wann sie als das durch den herkömmlichen Spalt separierte Doppelmembran-System anzutreffen waren (Malhotra et al., 1965; Malhotra, 1966):

In Säugergewebe, welches nach der Tötung des Tieres unverzüglich kryofixiert und anschließend kryosubstituiert worden war, beobachtete er bei fast allen Mitochondrien sowohl an der Hülle, als auch an ihren Cristae das fünflagige Doppelmembran-System. Nur 4% der Mitochondrien zeigten Cristae, deren Membranen passagenweise



Strukturmodelle zum Mitochondrienfeinbau nach unterschiedlichen Präparationen

zum Spalt auseinandergewichen waren.

Wurde das Gewebe jedoch nicht unverzüglich nach der Tötung des Tieres, sondern erst nach einer Wartezeit von acht Minuten bis zwei Stunden entnommen und analog präpariert, so zeigten sich nur noch die Hüllmembranen in der pentalaminaren Anordnung. Die Cristae-Membranen dagegen waren zum klassischen Spalt formiert.

Malhotra wertete die Entstehung des Cristae-Spaltes nach dem verzögerten Einfrieren als Erstickungszeichen der Zellen, was er dahingehend interpretierte, daß der Intracrista-Raum keine native Struktur mehr darstellt. Als Schlußfolgerung sieht er die in-vivo Struktur der Mitochondrien gekennzeichnet durch eng aneinanderliegende Membranen der Cristae und der Mitochondrienhülle. Der nach konventioneller chemischer Fixierung übliche elektronentransparente

Spalt als Membranzwischenraum würde erst nach einer Mitochondrienschädigung entstehen. Er stellt demnach einen Fixierungsartefakt dar. Die pentalaminar angeordneten Cristae-Membranen reagieren dabei bereits auf geringe Unregelmäßigkeiten im umgebenden Milieu unter Auseinanderweichen, während die äußere und die innere Membran in der Mitochondrienhülle stabiler aneinandergepreßt bleiben.

Mit der Technik des Gefrierbruchs ohne vorherigen Gefrierschutz, welche die direkte Untersuchung rein physikalisch fixierter Objekte gestattet, konnten van Venetie und Verkleij (1982) und Knoll und Brdiczka (1983) zeigen, daß die Bruchflächen entlang der Mitochondrienhülle nicht eine einzige Membran darstellten, sondern daß daran noch viele Fetzen einer zweiten Membran hingen. Das heißt, die Bruchebene wechselte beständig zwischen der inneren und äußeren Membran. Wären beide Membranen durch den Spalt getrennt, könnte kein Bruchebenenwechsel stattfinden. Nach Glutaraldehyd-Vorfixierung und Glycerin-Gefrierschutz resultierten die üblichen Bruchflächen entlang einer einzigen Membran.

Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen einen engen Kontakt zwischen innerer und äußerer Membran, der durch den Eingriff vieler bei der konventionellen Präparation verwendeter Substanzen gelöst wird. Sie konnten somit ebenfalls zeigen, daß der Membranspalt in der Mitochondrienhülle eine sekundär entstandene Struktur darstellt.

Bezüglich der Mitochondrienhülle bestätigen die vorliegenden Befunde an der gefriersubstituierten Chlamydomonas-Zygote eindeutig das Fehlen des Spaltes zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Die Tatsache, daß die pentalaminare Untergliederung nur stellenweise identifizierbar ist, liegt wohl nicht nur in einer ungünstigen Schnittrichtung begründet. Wahrscheinlicher ist es, die zumeist verschwommene Darstellung der aus zwei eng aneinanderliegenden Membranen bestehenden Mitochondrienhülle als Anzeichen für eine zum Zeitpunkt der Strukturstabilisierung bereits fortgeschrittene Extraktion von Membrankomponenten zu interpretieren. Die Stellen, die eine saubere optische Auflösung der fünf Lamina gestatten, wären demnach Stellen besserer Membranstrukturerhaltung (Knoll, Verkleij, persönl. Mitteilung).

Aufgrund der hier vereinzelt beobachteten vermutlichen Übergangsformen bei den hauptsächlich lamelliformen Cristae, kann ein enges Aneinanderliegen der diesen Cristae-Typ beschreibenden Membranen

im in-vivo Zustand nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der ausgesprochenen Instabilität der pentalaminaren Cristae-Strukturen (Malhotra, 1966) hat aber möglicherweise eine geringfügige Verschiebung im umgebenden Milieu während der Zeitspanne vom Präparationsbeginn bis zur Vitrifizierung den Cristae-Spalt entstehen lassen.

Ist der Spalt zwischen den parallel verlaufenden Flächen lamelliformer Cristae nach chemischer Fixierung durchaus als artefizielle Erweiterung einer nativ pentalaminaren Membrankonfiguration vorstellbar, so lassen sich die gegenwärtigen Modelle vom molekularen Aufbau der Biomembranen an Biegungsstellen der Membranen, z.B. am Rand lamelliformer Cristae und bei tubulären Cristae, kaum mit dem Fehlen eines Zwischenraumes vereinbaren. Dafür spricht auch, daß der zur Debatte stehende Raum am Rand lamelliformer Cristae in der Regel weiter ist als im Bereich der zueinander parallel verlaufenden Membranflächen. Meines Wissens liegen jedoch noch keine Befunde zu kryofixierten Mitochondrien des tubulären Typs vor, die eine endgültige Antwort auf diese Frage geben könnten.

5.5) Das Mitochondrienverhalten in der Chlamydomonas-Zygote

Ausgangssituation für die vorliegenden Untersuchungen war die Beobachtung eines zellstadienspezifischen Mitochondrienverhaltens während des vegetativen und der Anfangsphase des generativen Lebenszyklus von Chlamydomonas. Dabei wurde im Gameten ein einziges netzförmiges Riesenmitochondrium oder ein Netz und eine unbedeutende Anzahl sehr kleiner Mitochondrien gefunden (Grobe und Arnold, 1975; Grobe, 1976). Nach der Kopulation der Gameten wurde nicht überprüft, ob die Mitochondriennetze der Kreuzungspartner zunächst fusionieren. Dies ist aber wahrscheinlich, da in dem nahe verwandten Flagellaten Polytoma unmittelbar nach dem Verschmelzen der Gameten die Fusion beider Mitochondriennetze demonstriert werden konnte (Gaffal und Schneider, 1978). In jungen Chlamydomonas-Zygoten stellten dann Grobe (1976) und Grobe und Arnold (1977) den raschen Zerfall der Gametennetze in viele einfach gebaute kleine Einzelmitochondrien fest. Sie beobachteten diese Chondriomdisintegration während der ersten sieben Stunden des Zygotenstadiums und berichteten, daß in einer sieben Stunden alten Zygote schließlich 44 Einzelmitochondrien anzutreffen waren, wobei nur noch zwei Individuen geringfügige Verzweigungen besaßen.

Ältere Stadien konnten nicht analysiert werden, da die sich nun formierende impermeable und mächtige Zellwand eine zufriedenstellende Präparation für elektronenmikroskopische Untersuchungen verhinderte. Nachdem dieses technische Problem im methodischen Teil der vorliegenden Arbeit ausgeräumt werden konnte, galt es nun, mit Hilfe von Serienschnitt-Untersuchungen und dreidimensionaler Rekonstruktion des Mitochondrienbestandes der reifen sechs Tage alten Zygote Anzahl, Gestalt und räumliche Anordnung der Organelle zu ermitteln. Nach Vergleich mit den entsprechenden Befunden in der jungen Zygote sollte dies eine Aussage zum Mitochondrienverhalten während des Zygotenzyklus erlauben. Würde das Chondriom in noch mehr Individuen zerfallen, oder würde allmählich die Bildung größerer Aggregate einsetzen bzw. würde sich wieder ein hochverzweigtes Mitochondriennetz formieren? Die Beobachtung solcher Vorgänge würde auf die Fortsetzung der Mitochondrienmorphodynamik in einer sich nicht teilenden Zelle hinweisen.

5.5.1) Die Chondriommorphologie während des Zygotenzyklus
In fünf sechs Tage alten Zygoten wurde die Mitochondrienanzahl überprüft. In den Zellen A (46 Mitochondrien), B(75) und C (75) konnte sie genau ermittelt werden. In den Zellen D (ca. 35) und E (ca. 45) wurde sie anhand des analysierbaren Teils dieser Zygoten geschätzt. Trotz eines konstanten relativen Mitochondrienvolumens von 0,9% bezogen auf das Protoplastenvolumen unterliegt die numerische Zusammensetzung dieser fünf gleich alten Zellen also deutlichen Schwankungen (Tab.4, Seite 50).

Auch die Lage und Höhe der Maxima der Säulendiagramme, die die Mitochondrienpopulationen nach dem Volumenanteil ihrer Einzelindividuen am Chondriom in Fraktionen auflisten, sind bei den derartig überprüften Zygoten A - D verschieden (Diagramm 2, Seite 54-55). In den Diagrammen der Zellen B und C, die bereits in Bezug auf die numerische Chondriomzusammensetzung einander entsprachen, liegt das Maximum an der gleichen Stelle der Abszisse und auch die Höhe der jeweiligen Maxima stimmt gut überein. Bei den Zygoten A und D ist die häufigste Volumenfraktion dagegen deutlich nach rechts verschoben und die Höhe der Maxima ist wesentlich geringer als bei den Diagrammen zu Zygote B und C.

Weiterhin gilt es festzuhalten, daß die Werte für das relative Mitochondrienvolumen der jeweils größten und kleinsten Einzelorganelle in den Zygoten A,B und C weitestgehend übereinstimmen, während

Zygote D diesbezüglich deutlich abweicht (Diagramme 2 und 3, Seite 54-55 und 58-59).

Bei der Interpretation der bisher geschilderten Befunde ist zu berücksichtigen, daß die Mitochondriengesamtzahl sowie die Lage und Höhe des Maximums einer als Säulendiagramm dargestellten Mitochondrienpopulation wichtige Daten zur Charakterisierung eines Chondrioms liefern und Aufschluß über die Aufteilung der Mitochondrienmasse in einer Zelle geben (Gaffal, persönl. Mitteilung). Gelingt es, Zellen nicht nur anhand ihres Stadiums während eines synchronisierten Zyklus, sondern auch mit Hilfe stadienspezifischer zellulärer Markerstrukturen, wie Zellform, Basalkörper, Kernlokalisation, Kernvolumen oder Karyoplasmastruktur, eindeutig einem definierten Entwicklungsstadium zuzuordnen, dann erweist sich die numerische Zusammensetzung der Chondriome verschiedener Zellen des gleichen Entwicklungsstadiums innerhalb einer geringen Variationsbreite als recht konstant. Besonders eingehend wurde dies bei Polytoma (Gaffal und Schneider, 1980b) und jüngst auch bei vegetativen Chlamydomonas-Zellen (Gaffal, persönl. Mitteilung) untersucht und bestätigt.

Mit Ausnahme des Zellkerns fehlen der reifen Chlamydomonas-Zygote solche stadienspezifischen Markerstrukturen. Doch bereits die Streuung der gefundenen Mitochondrienzahlen zwischen 75 und ca. 35 erscheint zu breit, um bei den fünf untersuchten sechs Tage alten Zygoten noch von Zellen eines gleichen Entwicklungsstadiums sprechen zu können. Während die Zellen B und C aufgrund übereinstimmender Daten bezüglich Organellenzahl und Diagrammkurve offensichtlich dem gleichen Entwicklungsstadium entstammen, weichen die Zellen A, D und E hiervon deutlich ab.

Nicht nur die niedrigere Mitochondrienzahl, sondern auch die im Vergleich zu Zelle A deutlich höhere Volumenwerte annehmenden kleinsten und größten Einzelorganelle und vor allem die divergierenden quantitativen Kerndaten lassen weiterhin vermuten, daß das Entwicklungsstadium von Zygote D wiederum nicht mit demjenigen der Zelle A (und wahrscheinlich auch E) identisch ist. Es wurde nämlich festgestellt, daß bei Polytoma unterschiedliche relative Kernvolumina auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Zelle hinweisen (Gaffal et al., 1983). Da in Zygote D ein deutlich höheres relatives Kernvolumen und ein geringerer Nukleolusanteil gemessen wurden

(Tab.3, Seite 50), dürfte diese Zelle einem nicht nur von den Zygoten B und C, sondern auch von A und E verschiedenen, eigenständigen Entwicklungsstadium entstammen. Auch ihr im Vergleich zu den übrigen Zygoten stärker kondensiertes Karyoplasma deutet darauf hin (vgl. Abb.42d mit Abb.42a,b,c,e).

Aufgrund von Unterschieden in der Chondriommorphologie und den Kerndaten ist bis jetzt zusammenfassend festzuhalten, daß die Untersuchung von fünf reifen sechs Tage alten Zygoten mit ziemlicher Sicherheit Zellen aus drei verschiedenen Entwicklungsstadien erfaßte: A + E, B + C, D.

Mitochondrien verändern ihre Morphologie vor allem durch Teilungs- und Fusionsvorgänge. Diese Morphodynamik ist bekanntlich eine Antwort der Organelle auf Veränderungen der extra- oder intrazellulären Verhältnisse (Arnold und Gaffal, 1979a; Gaffal und Schneider, 1980b; Gaffal et al., 1986). Da während der Zygotenreifungsperiode die äußeren Bedingungen unverändert bleiben, kommen als Auslöser für die hier beobachtete Morphodynamik eigentlich nur intrazelluläre physiologische Faktoren in Betracht, über die zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden kann. Es darf hiermit jedoch als erwiesen gelten, daß die nach außen hin ruhende sich nicht teilende Chlamydomonas-Zygote in ihrem Inneren doch nicht ruht und die Mitochondrienmorphodynamik ihre Fortsetzung findet. Weiterhin sind in der Zygote aufgrund der wechselnden Mitochondrienzahlen Fusionsvorgänge zu erwarten, die, erfolgen sie zwischen verschiedenelterlichen Individuen, die Basis für die Kontaktaufnahme der Mitochondriengenome der Kreuzungspartner und damit die Voraussetzung für die sexuelle Rekombination der mitochondriengebundenen Erbinformation bereits in der Zygote schaffen.

Es ist zu fragen, ob die hier aufgezeigten Mitochondrienveränderungen und dazu nötigen Mitochondrienbewegungen überhaupt während der gesamten Reifungsperiode bis zur Fixierung am sechsten Tag stattfinden können, oder ob die Chondriome unterschiedlicher Morphologie lediglich Zustände zu früheren Zeitpunkten des Zygotenstadiums widerspiegeln, die dann während des weiteren Andauerns der ungünstigen äußeren Bedingungen unverändert beibehalten wurden.

Da die Zygote allgemein als "schlafende" Zelle (Levine und Ebersold, 1960) angesehen wird, die potentiell langlebig ist, erscheint es vom energetischen Standpunkt aus betrachtet zumindest denkbar,

daß sie, nachdem die zygotenspezifische Umorganisation der Strukturen mit der Fertigstellung der Zygotenwand abgeschlossen ist, sämtliche intrazellulären Aktivitäten und damit auch die Mitochondrienbewegungen auf ein kaum mehr erfaßbares Mindestmaß reduziert.

Sollte dieses Stoppen der intrazellulären Aktivitäten tatsächlich zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen, dann wäre aber eigentlich zu erwarten, daß es, gesteuert durch eine Art innere Uhr, in allen fünf hier untersuchten Zygoten zwar mit einer gewissen zeitlichen Verschiebung von Zelle zu Zelle, aber doch stets bei Erreichen desselben physiologischen Zustandes geschieht, nicht zuletzt, weil alle hier ausgewerteten Zygoten gleiche äußere Bedingungen vorfanden. Unter dieser Voraussetzung müßten dann aber auch alle fünf Chondriome, nach Reaktion auf diesen physiologischen Zustand (Gaffal et al., 1986) die gleiche Charakteristik vorweisen, bevor sie ihre Bewegungen einstellen.

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Chondriomunterschiede sprächen demnach gegen ein vorzeitiges Einstellen der Mitochondrienbewegung und für die Fortsetzung der Mitochondrienmorphodynamik während der gesamten Zygotenreifungsperiode. Die sichere Abklärung dieser Frage durch die zusätzliche Überprüfung etwas jüngerer Zygoten sollte aber späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Von besonderem Interesse war es nun natürlich, zu erfahren, worin möglicherweise die Unterschiede zwischen den Chondriomen der reifen und jungen Zygoten bestanden. Dies könnte auf die Art der Mitochondrienveränderungen zwischen beiden Untersuchungsstadien schließen lassen. Das aus den Analysen von Grobe (1976) und Grobe und Arnold (1977) verfügbare Material bezüglich junger Zygoten erlaubt einen Vergleich hinsichtlich Anzahl und Lage der Organelle in der Zelle, Chondriomgestalt nach Modellbau, relativem Chondriomvolumen, mittlerer kurzer Achse und durchschnittlicher langer Achse. Die Besprechung der Mitochondrientopographie erfolgt in einem späteren Kapitel.

Vor der Durchführung dieses Vergleichs ist aber abzuklären, ob die unterschiedlichen Präparationsmethoden - chemische Fixierung bei Grobe, Gefriersubstitution hier - überhaupt zusätzlich zu den Organellenzahlen und ihrer Topographie auch eine Gegenüberstellung der mit ihnen erhaltenen morphometrischen Daten erlauben.

Es kann angenommen werden, daß die Kryopräparation die Größe der Zellkompartimente in ihrem in-vivo Zustand beläßt. Sie soll keine Schwellungen oder Schrumpfungen verursachen und wird daher als das ideale Präparationsverfahren für morphometrisch nach Absolutwerten zu untersuchende Strukturen empfohlen (Sitte, 1982).

Weiterhin wurde gezeigt, daß besonders die Mitochondrien als empfindliche natürliche Osmometer auf die osmotischen Schwankungen während des konventionellen Präparationsganges mit Volumenveränderungen reagieren (Mathieu et al., 1978). Die Effekte der einzelnen Präparationsschritte - Glutaraldehyd: meist Schrumpfung; Osmium: meist Schwellung, aber auch Schrumpfung möglich; Alkoholentwässerung: Schrumpfung; nach Lee (1984) - sind in ihrer Summe nicht mehr kalkulierbar und werden das absolute Mitochondrienvolumen verfälschen. In diesem Zusammenhang ist uns auch eine Arbeit bekannt, die bei Krebs-Spermatozoen nach chemischer Fixierung ein größeres cytoplasmatisches Volumen aufzeigte als nach Kryopräparation (Reger et al., 1984).

Andererseits wurde aber festgestellt, daß trotz aller experimentellen Manipulationen mit ihrem Einfluß auf das absolute Chondriomvolumen das relative Mitochondrienvolumen bezogen auf das Zellvolumen unverändert bleibt (Schantz und Pellegrini, 1976-1977). Da Schwellungen bzw. Schrumpfungen der Mitochondrien vermutlich auch von Schwellungen bzw. Schrumpfungen des Protoplasten begleitet werden, dürfte man somit durch den Vergleich relativer Daten zu Ergebnissen mit geringerem Fehler gelangen (Sitte, 1967).

Außerdem ist der durch die morphometrische Auswertung eingebrachte Fehler wahrscheinlich schwerwiegender als derjenige, welcher bei der chemischen Fixierung einer gut penetrierbaren Zelle durch Schwellung oder Schrumpfung an den Mitochondrien entsteht, besonders dann, wenn die Meßwerte nicht nach Gaffal et al. (1982) korrigiert werden (Gaffal, persönl. Mitteilung).

Da die von Grobe untersuchten jungen Zygoten zum einen wohl problemlos chemisch fixierbar sind und zum anderen eine nachträgliche Korrektur der entsprechenden morphometrischen Ergebnisse möglich ist, sollten demnach auch das relative Mitochondrienvolumen und die Achsenwerte in den Vergleich der beiden auf verschiedenen Wegen präparierten Zygotenstadien einbezogen werden können. Die zu vergleichenden Daten sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Es gilt zu

Stadium	Mitochondrien-zahl	relatives Chondriomvolumen (%)	verzweigte Individuen	mittlere kurze Achse (µm)	lange Achse / kurze Achse	längste Individuen (µm)
Gamet	1	2,1	Netz	0,17	-------	-----
Zygote 15-30 Min.	18*	------	5*	0,22*	5,1*	-----
Zygote 1 Std.	20	1,8	7	-----	-------	-----
Zygote 2,5 Std.	57	1,8	10	0,28	2,4	-----
Zygote 7 Std.	44	1,5	2	0,35	1,7	3,0; 2,5***
Zygote 6 Tage:						
Zelle A	46	0,89	1	0,19	2,7	4,6; 4,0
Zelle B	75	0,90	7	0,20	2,8	8,5; 5,3
Zelle C	75	0,88	----	0,18	2,5	-----
Zelle D	35**	----	----	0,19	3,6	5,8
Zelle E	45**	----	----	----	----	----

Tab. 10: Die vergleichende Gegenüberstellung von Zellen aus dem generativen Lebenszyklus von Chlamydomonas reinhardii

Die Daten zum Gameten und der jungen Zygote stammen aus Grobe (1976) und Grobe und Arnold (1977).

* Diese Werte stellen das Mittel dar aus fünf Zygoten, die zwischen der 15. und 30. Minute nach dem Kreuzen fixiert wurden.

** Mitochondrienzahlen geschätzt, da Zellen nicht vollständig auswertbar

***Organellenlänge anhand des abgebildeten Modells und der Schnittanzahl grob geschätzt

---Keine Daten verfügbar

prüfen, ob Unterschiede in der Chondriommorphologie zwischen jungen und reifen Zygoten festzustellen sind:

Unter Zugrundelegung der Mitochondrienzahlen und dem bereits erbrachten Beweis, daß die fünf sechs Tage alten Zygoten drei verschiedenen Entwicklungsstadien angehören, könnte angenommen werden, daß die Mitochondrienpopulation während der Reifungsperiode ausgehend von den ca. 50 Mitochondrien der jungen Zygote zunächst weiter zerfällt (75 Organelle in den Zellen B und C), bevor sie sich wieder zu größeren Aggregaten formiert (ca. 35 Organelle in Zelle D, 46 Organelle in den Zellen A und E, bei gleichbleibendem relativem Chondriomvolumen). Der höhere Kondensationsgrad des Mitochondrieninventars D ist anhand der größeren relativen Volumenwerte für die jeweils kleinsten und größten Einzelorganelle nämlich eindeutig (Diagramm 2 und 3, Seite 54-55 und Seite 58-59). Diese Abfolge von Zerfall und Wiedervereinigung könnte stimmen, wenn die Voraussetzung zutrifft, daß der Zellkern in Zygote D aufgrund seines stärker kondensierten Karyoplasmas und seines disintegrierenden Nukleolus (Abb.42d; Tab.3, Seite 50) einem späteren Stadium angehört, da er nicht den von Triemer und Brown (1976) aufgestellten Kriterien eines prämeiotischen Interphase-Kernes mit wenig kondensiertem Karyoplasma genügt.

Auch wenn die sowohl höheren als auch niedrigeren Mitochondrienzahlen in älteren Zygoten beim Vergleich mit jüngeren Zygoten ein derartiges Geschehen nahelegen, erscheint die Festlegung auf eine genaue zeitliche Abfolge anhand der verfügbaren Daten doch etwas spekulativ. Eigentlich fehlen den in stickstoff-freiem Medium im Dunkel gehaltenen Zygoten der vorliegenden Arbeit die auslösenden äußeren Faktoren zum Verlassen der prämeiotischen Interphase (Stickstoff, Licht; Levine und Ebersold, 1960; Triemer und Brown, 1976). Solange auch über die Kernstrukturen in jüngeren Zygoten nichts bekannt ist, kann an dieser Stelle lediglich behauptet werden, daß in dem Zeitraum zwischen der jungen Zygotenphase und den hier untersuchten Stadien sowohl Zerfalls- als auch Fusionsbewegungen stattgefunden haben müssen.

Unter der Voraussetzung, daß die chemische Fixierung der jungen Zygoten keine Schwellung der Mitochondrienprofile verursacht und damit vor allem die Werte bezüglich der mittleren kurzen Achsen verfälscht hat, liefert der Vergleich der Achsenlängen ebenfalls Hinweise für Veränderungen der Chondriommorphologie zwischen jungen

und sechs Tage alten Zygoten (Tab.10, Seite 95):

Es ist bekannt, daß parallel zu den rhythmischen Gestaltsänderungen des Mitochondrieninventars während des vegetativen Zyklus von Polytoma unter anderem auch Veränderungen der mittleren kurzen Achsen zu beobachten sind (Gaffal et al., 1982). Anhand von deutlichen Variationen betreffend die mittleren kurzen Profilachsen kann also auf unterschiedliche physiologische Zustände der Zellen und dementsprechend unterschiedliche Chondriommorphologie geschlossen werden.

In den ersten Phasen des generativen Zyklus vom Gameten bis zur sieben Stunden alten Zygote ist eine kontinuierliche Zunahme der mittleren kurzen Achsen und eine Abnahme der durchschnittlichen langen Profilachsen festzustellen. Diese beiden Veränderungen führen zu einer Abnahme des Quotienten aus langer und kurzer Achse (zur Messung der langen Achsen siehe Tab.5, Seite 60). Der Quotient gibt ungefähren Aufschluß über die vorherrschende Gestalt der Individuen eines Chondrioms. Je niedriger er ist, um so mehr werden in einem Mitochondrienbestand rundliche Organelle zu- und der Anteil länglicher bzw. langgestreckter Organelle abnehmen. Die Verfolgung der Achsenwerte anhand Tabelle 10 (Seite 95) spiegelt das Zerfallsgeschehen des Gametennetzes wieder: Das Netzwerk aus relativ dünnen Mitochondrienfäden (0,17 µm) fragmentiert in Bruchstücke. Dabei ist eine beständige Zunahme von Bruchstücken mit größerer Dicke (0,35 µm) und geringerer Länge offensichtlich. Die fadenartige Charakteristik der Chondriomindividuen geht verloren. Der Quotient 1,7 bei der sieben Stunden alten Zygote zeigt, daß in dieser Zelle ovale bis kugelförmige Mitochondrien dominieren. Dies wurde auch durch Modellbau bestätigt: Ungefähr 70% der Individuen waren von ovaler bis kugelförmiger Gestalt (Grobe, 1976: Seite 99-100).

In der sechs Tage alten Zygote dagegen entspricht der Wert für die mittlere kurze Mitochondrienachse wieder in etwa demjenigen des Gameten. Er ist annähernd identisch mit dem der vegetativen Interphase-Zelle (Gaffal, persönl. Mitteilung). Der Wert der durchschnittlichen langen Achsen (Tab.5, Seite 60) hat sich im Vergleich zur sieben Stunden alten Zygote nur unwesentlich verändert. Da aber die Individuen jetzt deutlich dünner sind, nimmt der Quotient aus langer und kurzer Achse wiederum zu. Der Mitochondrienbestand hat folglich wieder fadenartigen Charakter. Dies wurde bereits aus den in den Tabellen 5 und 6 (Seite 60) ersichtlichen Ergebnissen ge-

folgert.

Der Unterschied in der Chondriommorphologie zwischen den zur Debatte stehenden Zygoten verschiedenen Alters zeigt sich also auch in der Gestalt der Individuen. Während in der jungen Zygote rundliche Organelle überwiegen, sind in der reifen Zygote die Mitochondrien vornehmlich als Fäden oder dünne Zylinder von variabler Länge anzusprechen. Diese Metamorphose der Mitochondriengestalt erfolgt möglicherweise über Teilungen oder Streckungen der einzelnen Individuen. Für Teilungen spricht der in zwei älteren Zygoten beobachtete numerische Mitochondrienzuwachs.

Ein Vergleich anhand der im Modell dargestellten Mitochondrieninventare (Grobe, 1976: Abb.23, Grobe und Arnold, 1977: Fig.1, vorliegende Arbeit: Abb.49-51) ergibt eine gestaltsmäßig heterogenere Zusammensetzung des Chondrioms in der sechs Tage alten Zygote. Neben zahlreichen kleinen sind hier auch recht viele bereits komplizierter gebaute Organelle anzutreffen, wie u.a. anhand der sieben Mitochondrien mit Verzweigungen in Zygote B gegenüber nur zwei derartigen Individuen in der sieben Stunden alten Zygote gezeigt werden kann (Tab.10, Seite 95).

Die jeweils längsten Mitochondrien sind ebenfalls im reifen Zygotenstadium anzutreffen (Tab.10, Seite 95). Hier darf aber die unterschiedliche Zellgröße nicht außer acht gelassen werden. Während Zelle B deutlich und Zelle A etwas größer ist als die sieben Stunden alte Zygote, ist Zygote D kleiner als letztere (Tab.2, Seite 49). Trotzdem übertrifft das längste Organell in Zelle D dasjenige in der jungen Zygote um beinahe das Doppelte.

Der kompliziertere Chondriombau und auch die längeren größten Einzelorganelle in der reifen Zygote weisen ebenfalls darauf hin, daß während der Zeitspanne zwischen den beiden hier verglichenen Zygotenstadien auch Fusionen stattfinden.

Zusammenfassend ist das morphologische Mitochondrienverhalten zwischen der ersten sechs Tage des Zygotenstadiums wie folgt zu charakterisieren: Nach dem Zerfall der Gametennetze in vornehmlich runde Bruchstücke findet ein Umbau zu den mehr zylinderförmigen Individuen der älteren Zygote mit teilweise komplizierterem Bau und größerer Länge statt. Die hieran beteiligten Teilungs-, Streckungs- und Fusionsvorgänge resultieren in einer wechselnden Chondriommorphologie. Es gibt Anhaltspunkte, daß diese Morphodynamik während

des ganzen bisher beobachteten Zygotenstadiums anhält.

5.5.2) Die Volumenrelation des Chondrioms in der Zygote
Bei der Betrachtung des relativen Chondriomvolumens ergibt sich für die drei vollständig ausgewerteten Zygoten A,B und C mit 0,9% ein identischer Anteil am Protoplastenvolumen (Tab.10, Seite 95). Trotz unterschiedlicher Entwicklungsstadien und differierender Zellgrößen ist die reife sechs Tage alte Zygote mit einem konstanten Anteil an Mitochondrienmaterial ausgestattet. Es überrascht aber sehr, daß der hier gefundene Wert nur etwa halb so groß ist, wie derjenige in der jungen Zygote, wobei in letzterer ausgehend vom Gameten (2,1%) bereits eine leichte Abnahme innerhalb der ersten sieben Stunden (1,5%) vermutet werden kann.

Sowohl die von Blank (1980) untersuchten vegetativen Zellen und Gameten mit 1,5 - 1,8% Mitochondrienanteil, als auch eine unlängst unternommene Überprüfung an Zellen des vegetativen Zyklus mit 1,9% (Gaffal, persönl. Mitteilung) ergaben für haploide Chlamydomonas-Zellen einen in etwa gleichbleibenden Mitochondriengehalt. Während dieser gut mit demjenigen des Gameten und der eine Stunde alten Zygote korreliert, stellt er dagegen ziemlich genau das Doppelte des Mitochondrienanteils der reifen Zygote dar.

Nicht nur für Chlamydomonas, sondern auch für andere Algen, wie Chlorella (Atkinson et al., 1974), Euglena (Pellegrini, 1980) und Polytoma (Gaffal et al., 1982), konnte für den vegetativen Lebenszyklus eine Konstanz in der Mitochondrienausstattung ermittelt werden, was Ähnliches eigentlich auch während des generativen, diesbezüglich noch nicht untersuchten Zyklus erwarten läßt.

Aus den vorherigen Betrachtungen ging hervor (Seite 94), daß an den Mitochondrien der jungen Zygoten durch die chemische Fixierung wohl kaum solche Schwellungen gesetzt werden, die eine artefizielle Zunahme ihres relativen Chondriomvolumens auf beinahe das Doppelte desjenigen der gefriersubstituierten sechs Tage alten Zygoten erklären würden. Die deutliche Differenz im relativen Chondriomvolumen zwischen diesen beiden Zygotenstadien dürfte vielmehr eine biologische Ursache haben.

Aufgrund einer vermutlich geringeren metabolischen Aktivität einer älteren Zygote verglichen mit vegetativen Zellen könnte ihr geringerer Energiebedarf den niedrigen Mitochondrienanteil erklären. Hierfür spricht der Befund, daß in Nieren- und Herzmuskel-

zellen das Mitochondrienvolumen oftmals mit dem Energieumsatz der Zelle direkt korreliert ist (Gaffiero et al., 1983; LeFurgey et al., 1984).

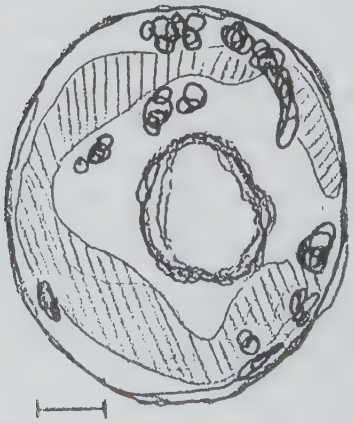
Weiterhin wurden in den reifen Zygoten Mitochondrien beobachtet, die aufgrund ihrer Ultrastruktur (bleiche Organellenmatrix, diffuse Cristaestrukturen) zu degenerieren scheinen (Abb.48a,b,c,). Ähnliches war auch in Polytoma (Gaffal und Schneider, 1980a) und im Kaninchenzwerchfell (Geissinger et al., 1984) anzutreffen, doch dort blieb der Mitochondrienanteil pro Zelle unverändert. Bei den Zygoten sind diese offensichtlich nicht mehr funktionsfähigen Organelle möglicherweise mit dem Rückgang des Mitochondriengehaltes in Verbindung zu bringen: Während bei Chlamydomonas erwiesen ist, daß durch den Abbau der väterlichen Plastiden-DNA-Nukleoide innerhalb von sechs Stunden nach der Gametogamie der einelterliche Vererbungsmodus der Plastidengene zustande kommt (Sager und Lane, 1972; Kuroiwa et al., 1982; Coleman und Maguire, 1983), gibt es bezüglich der Mitochondrien hierfür weder einen eindeutig bestätigenden noch einen widersprechenden Befund. Da alle hier untersuchten älteren Zygoten nur über die Hälfte der eigentlich zu erwartenden Mitochondrienausstattung verfügen, erscheint zum jetzigen Zeitpunkt ein einelterlicher Abbau der Mitochondrien-DNA und ihrer Trägerorganelle denkbar. Erst wenn Mitochondrien-Mutanten für Kreuzungsexperimente zur Verfügung stehen, wird sich diese Frage genauer beantworten lassen.

5.5.3) Die topographische Verteilung der Mitochondrien in der Zygote

Die Überprüfung der Mitochondrienlokalisation in der sechs Tage alten reifen Zygote erbrachte als Ergebnis, daß etwa ein Drittel des numerischen Mitochondrienbestandes innerhalb der Plastide, welche wie ein Gürtel die zentrale Zellregion gegen die Zellperipherie abgrenzt, in mehr zentralen Zygotenbereichen oder sogar in unmittelbarer Nähe der Kernmembran anzutreffen war. Da dieser derart lokalisierte Teil der Population aber ungefähr 50% der gesamten Mitochondrienmasse einer Zygote repräsentiert, wird aus der Volumenrelation eher anschaulich, daß es sich hierbei zum einen vornehmlich um Mitochondrien mit größerem Volumen handelt und zum anderen in diesem Zygotenstadium die Kernregion den bevorzugten Aufenthaltsort der Mitochondrien darstellt (siehe Skizzen 1-7, Seite 65-66,

Tab.9, Seite 67). Wie aus den morphologischen Betrachtungen dieser Arbeit bereits hervorging, handelt es sich bei den größeren Mitochondrien im vorliegenden Zygotenstadium meist um Organelle mit deutlich langgestreckter Gestalt. Tatsächlich zeigen auch bereits Einzelschnitte lange fadenförmige Individuen, die den Kontakt mit der Kernregion über ein Durchqueren des Plastidengürtels richtiggehend zu suchen scheinen.

Diese Topographie der Mitochondrien in reifen Zygoten ist bemerkenswert. Soweit für vegetative Chlamydomonas-Zellen bis jetzt bekannt ist, befindet sich der größte Teil ihres Mitochondrieninventars mit Ausnahme des zur sechsten Lichtstunde des synchronisierten Zyklus entnommenen Stadiums in dem cytoplasmatischen Spalt zwischen Plasmalemma und Chloroplast oder in der Nähe der Geißelbasis (Blank, 1980). Zu Beginn des generativen Zyklus umspannt im Gameten das Mitochondriennetz die Plastide und steht nur über zwei die Plastide durchbrechende Ausläufer mit der Kernzone in Verbindung (Grobe, 1976). Im zentralen Bereich einer eine Stunde alten Zygote sind vor der Karyogamie in unmittelbarer Kernnähe noch etliche Mitochondrienanschnitte zu erkennen (Grobe, 1976), was auch für die junge Polytoma-Zygote vor der Karyogamie zutrifft (Gaffal und Schneider, 1978). Nach der Karyogamie waren dagegen in der sieben Stunden alten Chlamydomonas-Zygote nur noch sechs ihrer 44 Mitochondrien im zentralen Zygotenbereich lokalisiert und kein einziges in enger Nachbarschaft zum Zellkern (Grobe, 1976; siehe auch nachfolgende Skizze). Nach der Karyogamie im entsprechenden Zygotenstadium bei Polytoma sind die Verhältnisse aufgrund der nun vornehmlich peripheren Lokalisierung der Mitochondrienprofile wiederum sehr ähnlich.



Nachträglich anhand von Grobe (1976) angefertigte topographische Skizze aus 20 aufeinanderfolgenden Schnitten, die den Medianbereich des Kernes einer sieben Stunden alten Zygote erfassen.

Es sind zwar Mitochondrien innerhalb des Plastidengürtels (schraffiert), aber keines in unmittelbarer Kernnähe anzutreffen.

Vgl. mit Skizzen 1-5, Seite 65!

Bar = 1µm;

Die Nähe sehr vieler Mitochondrien zum Zellkern in der reifen Chlamydomonas-Zygote kann kein Zufallsergebnis sein, da einer wahllosen Verteilung der Organelle auch in zentralere Zellregionen der Chloroplast im Wege steht. Nachdem die Mitochondrien in der sehr jungen Zygote noch hauptsächlich außerhalb, aber später, in der reifen Zygote zu einem bedeutenden Anteil innerhalb der Plastide und in Kernnähe vorgefunden werden, können nur gezielte Mitochondrienbewegungen für diese Umverteilung verantwortlich sein, die eine stadienspezifische funktionelle Bedeutung haben muß.

Gerichtete Bewegungen bzw. Ortsveränderungen der Mitochondrien gelten im allgemeinen als cytoskelettvermittelt (Lambert und Lambert, 1983; Lockhausen und Kristen, 1983; Schliwa, 1984; Summerhayes et al., 1984; Bridgman et al., 1986). Andererseits werden aber auch autonome vom metabolischen Zustand abhängige Mitochondrienbewegungen beschrieben (Bereiter-Hahn, 1978; Bereiter-Hahn und Voeth, 1983), doch es gibt Hinweise, daß diese eigenständigen Organellenbewegungen ungerichtet sind (Martz et al., 1984; Salmeen et al., 1985).

Eine Verantwortlichkeit des Cytoskeletts für die hier zu diskutierenden offensichtlich gerichteten Mitochondrienbewegungen ist jedoch unwahrscheinlich. Ein im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit nicht erwähnter morphologischer Befund war, daß im Cytoplasma der reifen Zygote keinerlei filamentäre oder tubuläre Strukturen anzutreffen waren. Gerade die hier angewandte Gefriersubstitution erwies sich aber in der Darstellung dieser empfindlichen Organelle der konventionellen chemischen Fixierung überlegen (Howard und Aist, 1979; Heath et al., 1984; McKerracher und Heath, 1985; Sandoz et al., 1985), so daß eine präparationsbedingte Zerstörung der Cytoskelettelemente mit deren anschließender Nichterfassung am Elektronenmikroskop mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Weiterhin gibt es weder in der Literatur noch aus unseren Arbeiten an Chlamydomonas bzw. Polytoma Hinweise, die für das Vorhandensein eines Cytoskeletts in sehr jungen Zygoten sprechen. Die vorübergehende Existenz eines Cytoskeletts in jüngeren noch nicht untersuchten Zygoten kann aber zum jetzigen Zeitpunkt nicht völlig ausgeschlossen werden.

Trotz der Ungewißheit bezüglich der Mechanik erscheint uns die zielgerichtete Mitochondrienbewegung zum Zellkern als spezifisches Merkmal des Chondrioms in der reifen zur Meiose bereiten

Chlamydomonas-Zygote. Da gerade die jeweils längeren Mitochondrien in den hier untersuchten Zellen immer beim Durchqueren des Chloroplasten beobachtet werden konnten, bereitet der Umbau der in der jungen Zygote angetroffenen rundlichen Chondriombruchstücke in dünnere Organelle von länglicher Gestalt möglicherweise die Bewegung zum Kern vor. Des weiteren könnten gerade die sehr langen, sich beinahe über den gesamten Protoplastendurchmesser erstreckenden Mitochondrien mit ihrem passagenweisen Verlauf in unmittelbarer Kernnähe unter Umständen für eine relativ große Mitochondrienmasse die morphologische Voraussetzung für einen zumindest abschnittsweisen Kontakt sowohl mit dem Zellkern als auch mit der Zellperipherie schaffen.

Die stadienspezifische Bewegung der Mitochondrien zum Zellkern hin dient möglicherweise dem Erzielen einer Wechselwirkung zwischen diesen Organellen. Aufgrund der in den Spermatocyten der Fliegen Drosophila (Ito, 1960) und Rynchosciara (Casartelli und Basile, 1982) zu Beginn der Meiose ebenfalls vornehmlich in unmittelbarer Kernnähe beobachteten Mitochondrien kann vermutet werden, daß diese Topographie ein Symptom eines in unterschiedlichen Objekten nach ähnlichem Schema ablaufenden Differenzierungsvorganges darstellt, wie es zum Beispiel bei der Mitose der Fall ist. Die Nähe zum Kern könnte dabei ein schnelles Reagieren der Mitochondrien auf von dort ausgehende Änderungen der physiologischen Verhältnisse begünstigen.

6) Zusammenfassung

6.1) Ziel der vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen war die Analyse der Mitochondrienanordnung in älteren Zygoten der Grünalge Chlamydomonas reinhardii mit Hilfe der Serienschnitt-Technik mit nachfolgender dreidimensionaler Rekonstruktion und morphometrischer Auswertung. Sie sollten einerseits die bisherigen Arbeiten am Mitochondriensubzyklus in Chlamydomonas mit den Daten eines weiteren noch nicht überprüften Lebensstadiums ergänzen. Andererseits würde eine vergleichende Betrachtung des Chondrioms junger Zygoten (Grobe, 1976; Grobe und Arnold, 1977) mit demjenigen älterer Zygoten nicht nur zum Mitochondrienverhalten im Laufe des Zygotenstadiums Auskunft geben, sondern zusätzlich erkennen lassen, ob die in teilungsaktiven vegetativen Zellen und Gameten beobachtete entwicklungsstadienspezifische Mitochondrienmorphodynamik auch in der ruhenden sich nicht teilenden Zygote beibehalten wird.

6.2) Die Präparation älterer Zygoten zur elektronenmikroskopischen Untersuchung ihrer Mitochondrien wurde bisher durch die dicke impermeable Zygotenwand verhindert. Im methodischen Abschnitt der vorliegenden Arbeit war also zunächst eine Präparationstechnik zu entwickeln, welche die Beobachtung der beweglichen und sehr empfindlichen Mitochondrien unter Vermeidung größerer artefizieller Schädigung in diesen schwer fixierbaren Zellen ermöglicht.

6.3) Die konventionelle chemische Fixierung erwies sich an diesem Objekt trotz umfangreicher Abwandlung als unzureichend. Selbst nach speziellen Vorbehandlungen, die das Diffundieren der Fixantien ins Zygoteninnere durch partielle Zellwandlyse oder Störung der Zellwandformation erleichtern sollten, erfolgte die Fixation noch immer zu langsam, um die Mitochondrienstrukturen in einem möglichst lebensnahen und für die vertrauenswürdige Auswertung geeigneten Zustand zu stabilisieren.

6.4) Die anschließende Einführung der für Algenzellen noch neuartigen Technik der Gefriersubstitution erhöhte unseren methodischen Aufwand. Sie ermöglichte aber schließlich, durch Immersionskryofixierung in Flüssigpropan von -190°C und nachfolgende Kryosubstitution bei -80°C in Aceton / Osmium 4% eine für die hier geplanten Untersuchungen ausreichende Anzahl von Zygoten mit her-

vorragender Strukturerhaltung zu präparieren.

6.5) Die vorliegende Arbeit beschreibt somit nicht nur erstmals die Mitochondrienstrukturen in der reifen sechs Tage alten Chlamydomonas-Zygote, sondern auch die erstmalige Dünnschnittuntersuchung von Algenzellen, die mit dieser der konventionellen chemischen Fixierung überlegenen Methode präpariert wurden.

6.6) Es konnten bereits vorliegende Befunde bestätigt werden, die besagen, daß der nach chemischer Fixierung der Mitochondrien übliche elektronentransparente Spalt zwischen äußerer und innerer Hüllmembran ein Fixierungsartefakt ist und beide Membranen der Organellenhülle in vivo eng aneinanderliegen.

6.7) Der Vergleich der Mitochondrienbestände mehrerer sechs Tage alter Zygoten hinsichtlich Organellenzahl und individueller Zusammensetzung ergab Unterschiede in der Chondriommorphologie, denen vor allem Mitochondrienteilungen und -fusionen zugrunde liegen. Die Fortsetzung der Morphodynamik des Chondrioms auch während der Ruhephase der Zygote ist aufgrund der verschiedenen Entwicklungsstadien der hier ausgewerteten Zellen wahrscheinlich.

6.8) Nach Vergleich der Chondriommorphologie junger Zygoten mit derjenigen sechs Tage alter Zygoten, in den auch maßstabsgetreue dreidimensionale Modelle einbezogen wurden, stand fest, daß ein Gestaltswechsel der zunächst vornehmlich rundlichen Organelle in überwiegend zylinderförmige Individuen mit teilweise größerer Länge und komplizierterem Bau stattgefunden hatte.

6.9) Die Topographie der Mitochondrien in der sechs Tage alten Zygote ist gekennzeichnet durch eine im Vergleich zu jungen Zygoten erhöhte Organellendichte innerhalb des Plastidengürtels und den häufigen, in jungen Zygoten nicht beobachteten Kontakt einzelner Individuen mit dem Zellkern. Dieser teilweisen Umverteilung des Chondrioms müssen gerichtete und vermutlich nicht cytoskelettvermittelte Mitochondrienbewegungen zugrunde liegen, die funktionell eine Wechselwirkung zwischen Kern und Mitochondrium bezwekken.

6.10) Die morphometrische Auswertung ergab für die sechs Tage alten Zygoten übereinstimmend ein relatives Mitochondrienvolumen von 0,9% des Zellvolumens. Überraschenderweise ist dieses hier aber nur halb so groß wie in vegetativen Zellen, Gameten oder sehr

jungen Zygoten. Die möglichen Ursachen dieser geringeren Mitochondrienausstattung werden diskutiert.

7) Literaturverzeichnis

1) Albin, T.B.
Handling and toxicology.
in: Acrolein, pp. 234-239.
Smith, C.W., ed.
New York: Wiley, 1962

2) Ansell, P.J., Young, T.W.K.
Light and electron microscopy of Mortierella indohii zygospores.
Mycologia 75, 64-70 (1983)

3) Arnold, C.G., Gaffal, K.P.
Extranukleäre Vererbung. Die Morphologie extranukleärer Erbträger im Verlauf des Lebenszyklus.
in: Progress in Botany, vol. 41, pp. 212-220.
Ellenberg, H., Esser, K., Kubitzki, K., Schnepf, E., Ziegler, H., eds.
Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1979a

4) Arnold, C.G., Gaffal, K.P.
Die räumliche Struktur von Mitochondrien und Plastiden.
Biologie in unserer Zeit 9, 45-51 (1979b)

5) Arnold, C.G., Schimmer, O., Schötz, F., Batheld, H.
Die Mitochondrien von Chlamydomonas reinhardii.
Arch. Mikrobiol. 81, 50-67 (1967)

6) Atkinson, A.W., John, P.C.L., Gunning, B.E.S.
The growth and the division of the single mitochondrion and other organelles during the cell cycle of Chlorella, studied by quantitative stereology and three-dimensional reconstruction.
Protoplasma 81, 77-109 (1974)

7) Bahr, G.F., Bloom, G., Friberg, U.
Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide or formaldehyde and during subsequent treatment.
Exp. Cell Res. 12, 342-355 (1957)

8) Barlow, D.J., Sleigh, D.A.
Freeze substitution for preservation of ciliated surfaces for scanning electron microscopy.
J. Microsc. 115, 81-95 (1979)

9) Bastia, D.J., Chiang, S., Swift, H.
Chloroplast dedifferentiation and redifferentiation during zygote maturation and germination in Chlamydomonas reinhardii.
J. Cell Biol. 43, 11a (1969)

10) Bearer, E.L., Orci, L.
A simple method for quick-freezing.
J. Electron Microsc. Tech. 3, 233-241 (1986)

11) Bereiter-Hahn, J.
Beziehungen von Feinstruktur und mitochondrialer Formgebung.
Cytobiologie 12, 429-439 (1976)

12) Bereiter-Hahn, J.
Intracellular motility of mitochondria: role of the inner compartment in migration and shape changes of mitochondria in XTH-cells.
J. Cell Sci. 30, 99-116 (1978)

13) Bereiter-Hahn, J., Inst. Wiss. Film
Mitochondrien - Bewegung, Teilung und Fusion.
Film D 1455 des IWF, Göttingen 1982.
Publikation von J. Bereiter-Hahn, Publ. Wiss. Film, Sekt. Biol., Ser. 16, Nr. 7/D 1455 (1983)

14) Bereiter-Hahn, J., Vöth, M.
Metabolic control of shape and structure of mitochondria in situ.
Biol. Cell 47, 309-323 (1983)

15) Blank, R.
Mikromorphologische Untersuchungen zu zellstadienspezifischen und chloramphenicolinduzierten Veränderungen am Chondriom von Chlamydomonas reinhardii.
Erlangen: Dissertation 1980

16) Blank, R., Grobe, B., Arnold, C.G.
Time-sequence of nuclear and chloroplast fusions in the zygote of Chlamydomonas reinhardii.
Planta 138, 63-64 (1978)

17) Blank, R., Hauptmann, E., Arnold, C.G.
Variability of mitochondrial population in Chlamydomonas reinhardii.
Planta 150, 236-241 (1980)

18) Borysko, E., Sapranauskas, P.
A new technique for comparative phase contrast and electron microscope studies of cells grown in tissue culture, with an evaluation of the technique by means of the time lapse cinematography.
Bull. Johns Hopk. Hosp. 95, 68-79 (1954)

19) Brand, N., Arnold, C.G.
Improved structural preservation of the mature zygote of Chlamydomonas reinhardii by freeze-substitution fixation compared with chemical fixation with special attention to the mitochondria.
Endocyt. C. Res. 3, 79-85 (1986)

20) Bridgman, P.C., Kachar, B., Reese, T.S.
The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cells. II. Cytoplasmic domains associated with organelle movements.
J. Cell Biol. 102, 1510-1521 (1986)

21) Broadwater, S., Scott, J.
Three-dimensional reconstruction of the chondriome of the unicellular red alga Rhodella reticulata.
J. Cell Sci. 84, 213-220 (1986)

22) Brown, R.M., Johnson, C., Bold, H.C.
Electron and phase contrast microscopy of sexual reproduction in Chlamydomonas moewusii.
J. Phycol. 4, 100-120 (1968)

23) Browning, A.J., Gunning, B.E.S.
An ultrastructural and cytochemical study of the wall-membrane apparatus of transfer cells using freeze-substitution.
Protoplasma 93, 7-26 (1977)

24) Bullock, G.R.
The current status of fixation for electron microscopy: a review.
J. Microsc. 133, 1-16 (1984)

25) Calvayrac, R., Bertaux, D., Lefort-Tran, M., Valencia, R.
Généralisation du cycle mitochondrial chez Euglena gracilis Z. en cultures synchrones, hétérotrophe et phototrophe.
Protoplasma 80, 355-370 (1974)

26) Casartelli, C., Basile, B.
Mitochondrial transformations and origin of axial filament during spermatogenesis in Rynchosciara.
Rev. Brasil. Genet. 5, 651-669 (1982)

27) Catt, J.W.
The isolation and chemical composition of the zygospore cell wall of Chlamydomonas reinhardii.
Plant Sci. Lett. 15, 69-74 (1979)

28) Cavalier-Smith, T.
Electron microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of Chlamydomonas reinhardii.
Nature 228, 333-336 (1970)

29) Cavalier-Smith, T.
Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of Chlamydomonas reinhardii.
J. Cell Sci. 16, 529-556 (1974)

30) Cavalier-Smith, T.
Electron microscopy of zygospore formation in Chlamydomonas reinhardii.
Protoplasma 87, 297-315 (1976)

31) Chandler, D.E.
Comparison of quick-frozen and chemically fixed sea-urchin eggs: structural evidence that cortical granule exocytosis is preceeded by a local increase in membrane mobility.
J. Cell Sci. 72, 23-36 (1984)

32) Coleman, A., Maguire, M.J.
Cytological detection of the basis of uniparental inheritance of plastid DNA in Chlamydomonas moewusii.
Curr. Genet. 7, 211-218 (1983)

33) Costello, M.J., Corless, J.M.
The direct measurement of temperature changes within freeze-fracture specimens during quenching in liquid coolants.
J. Microsc. 112, 17-37 (1978)

34) Costello, M.J., Fetter, R., Corless, J.M.
Optimum conditions for the plunge freezing of sandwiched samples.
in: Science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis, pp. 105-116.
Revel, J.P., Barnard, T., Haggis, G.H., eds.
Chicago: SEM Inc., AMF O'Hare, 1984

35) Couchman, J.R., Rees, D.A.
Organelle-cytosceleton relationships in fibroblasts - mitochondria, golgi apparatus and endoplasmic reticulum in phases of movement and growth.
Eur. J. Cell Biol. 27, 47-54 (1982)

36) Davies, D.R., Plaskitt, A.
Genetical and structural analysis of cell-wall formation in Chlamydomonas reinhardii.
Genet. Res. 17, 33-43 (1971)

37) Dempsey, G.P., Bullivant, S.
A copper block method for freezing of non-cryoprotected tissue to produce ice-crystal-free regions for electron microscopy. I. evaluation using freeze-substitution.
J. Microsc. 106, 251-260 (1976)

38) Elbers, P.F.
Ion permeability of the egg of Limnaea stagnalis L. on fixation for electron microscopy.
Biochim. Biophys. Acta 112, 318-329 (1966)

39) Feder, N., O'Brien, T.P.
Plant microtechnique: some principles and new methods.
Amer. J. Bot. 55, 123-142 (1968)

40) Feder, N., Sidman, R.L.
Methods and principles of fixation by freeze-substitution.
Biophys. Biochem. Cytol. 4, 593-601 (1958)

41) Fineran, B.A., Fineran, J.M.
Teliospores of Entorrhiza casparyana: a correlated thin sectioning and freeze-fracture study of endogenously dormant spores.
Can. J. Bot. 62, 2525-2539 (1984)

42) Fisher, D.B., Housley, T.L.
The retention of water-soluble compounds during freeze-substitution and microautoradiography.
Plant. Physiol. 49, 166-171 (1972)

43) Franke, W.W., Krien, S., Brown, R.M.
Simultaneous glutaraldehyde-osmiumtetroxide fixation with post-osmication. An improved fixation procedure for electron microscopy of plant and animal cells.
Histochemistry 19, 162-164 (1969)

44) Gaffal, K.P., Gaffal, S.I., Schneider, G.J.
Morphometric analysis of several intracellular events ocurring during the vegetative life cycle of the unicellular alga Polytoma papillatum.
Protoplasma 110, 185-195 (1982)

45) Gaffal, K.P., Kreutzer, D.
The mitochondria of Polytoma papillatum at two different stages of the vegetative cell cycle.
Protoplasma 91, 167-177 (1977)

46) Gaffal, K.P., Schneider, G.J.
The changes in ultrastructure during fertilization of the colorless flagellate Polytoma papillatum with special reference to the configural changes of their mitochondria.
Cytobiologie 18, 161-171 (1978)

47) Gaffal, K.P., Schneider, G.J.
Morphogenesis of the plastidome and the flagellar apparatus during the vegetative life cycle of the colorless phytoflagellate Polytoma papillatum.
Cytobios 27, 43-61 (1980a)

48) Gaffal, K.P., Schneider, G.J.
Numerical, morphological and topographical heterogeneity of the chondriome during the vegetative life cycle of Polytoma papillatum.
J. Cell Sci. 46, 299-312 (1980b)

49) Gaffal, K.P., Wolf, K.W., Schneider, G.J.
Morphometric and chronobiological studies on the dynamics of the nuclear envelope and the nucleolus during mitosis of the colorless phytoflagellate Polytoma paillatum.
Protoplasma 118, 19-35 (1983)

50) Gaffal, K.P., Wolf, K.W., Friedrichs, G.J.
Morphometric studies on ultrastructural modifications of the chondriome induced in the colorless phytoflagellate Polytoma papillatum by growing on agar solidified nutrient.
Biol. Cell 55, 97-106 (1986)

51) Gaffiero, P., Bergeron, M., Thiery, G.
Morphological study of cell organelles during development. II. the mitochondria of the renal and intestinal epithelium.
Biol. Cell 49, 163-168 (1983)

52) Geissinger, H.D., Bhatnagar, M.K., Friesen, D.L.
Comparison of mitochondria between adult and neonate rabbit muscle: a scanning and transmission electron microscopic study.
Trans. Am. Microsc. Soc. 103, 275-283 (1984)

53) Gilkey, J.C., Staehelin, L.A.
Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure.
J. Electron. Microsc. Tech. 3, 177-210 (1986)

54) Gresshoff, P.M.
Culture of Chlamydomonas reinhardii protoplasts in defined media.
Aust. J. Plant Physiol. 3, 457-464 (1976)

55) Grobe, B.
Untersuchungen zum Mitochondrienverhalten in der Zygote von Chlamydomonas reinhardii.
Erlangen: Dissertation 1976

56) Grobe, B., Arnold, C.G.
Evidence of a large ramified mitochondrium in Chlamydomonas reinhardii.
Protoplasma 86, 291-294 (1975)

57) Grobe, B., Arnold, C.G.
The behaviour of mitochondria in the zygote of Chlamydomonas reinhardii.
Protoplasma 93, 357-362 (1977)

58) Harvey, D.M.R.
Freeze substitution
J. Microsc. 127, 209-221 (1982)

59) Haug, T., Altner, H.
A cryofixation study of presumptive hygroreceptors on the antennule of a terrestrial isopod.
Tissue Cell 16, 377-392 (1984a)

60) Haug, T., Altner, H.
A cryofixation study of a subcuticular receptor organ in the antennular tip of the terrestrial isopod, Porcellio scaber Latr. (Crustacea).
J. Ultrastruct. Res. 87, 62-74 (1984b)

61) Hayat, M.A.
Principles and techniques of electron microscopy, vol.1.
New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1970

62) Hayat, M.A.
Fixation for electron microscopy.
London: Academic Press, 1981

63) Heath, I.B., Rethoret, K., Moens, P.B.
The ultrastructure of mitotic spindles from conventionally fixed and freeze-substituted nuclei of the fungus Saprolegnia.
Eur. J. Cell Biol. 35, 284-295 (1984)

64) Hereward, F.V., Northcote, D.H.
A simple freeze-substitution method for the study of ultrastructure of plant tissues.
Exp. Cell Res. 70, 73-80 (1972)

65) Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J., Jan, Y., Jan, L.
Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release.
J. Cell Biol. 81, 275-300 (1979)

66) Heywood, P.
Evidence from serial sections that some cells contain large numbers of mitochondria.
J. Cell Sci. 26, 1-8 (1977)

67) Hippe, S.
Ultrastructure of haustoria of Erisyphe graminis f. sp. hordei preserved by freeze-substitution.
Protoplasma 129, 52-61 (1985)

68) Hoffmann, H.P., Avers, C.J.
Mitochondria of yeast: ultrastructural evidence for one giant branched organelle per cell.
Science 181, 749-750 (1973)

69) Howard, R.J., Aist, J.R.
Hyphal tip cell ultrastructure of the fungus Fusarium: improved preservation by freeze-substitution.
J. Ultrastruct. Res. 66, 224-234 (1979)

70) Humbel, B., Marti, Th., Müller, M.
Improved structural preservation by combining freeze substitution with low temperature embedding.
in: Beiträge zur elektronenmikroskopischen Direktabbildung von Oberflächen, vol. 16, pp. 585-594.
Pfefferkorn, G., ed.
Antwerpen: 1983

71) Humbel, B., Müller, M.
Freeze substitution and low temperature embedding.
in: Science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis, pp. 175-183.
Bhatt, S.A., Müller, M., Becker, K.P., Boyde, A., Wolosewick, J.J., eds.
Chicago: SEM Inc., AMF O'Hare, 1986

72) Hunziker, E.B., Schenk, R.K.
Cryomethods for transmission electron microscopy of calcifying cartilage.
in: Methods of calcified tissue preparation, pp. 199-218.
Dickson, G.R., ed.
Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984

73) Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., Haskins, C.P.
Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms.
Proc. Amer. Phil. Soc. 94, 152-170 (1950)

74) Ito, S.
The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of Drosophila virilis.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 433-442 (1960)

75) Ito, T., Ichikawa, A.
An electron microscopic observation of rat peritoneal cells processed by rapid freezing and freeze substitution fixation.
J. Electron Microsc. 31, 235-248 (1982)

76) Jones, G.J.
On estimating freezing times during tissue rapid freezing.
J. Microsc. 136, 349-360 (1984)

77) Kates, J.R., Jones, R.F.
The control of gametic differentiation in liquid cultures of Chlamydomonas.
J. Comp. Cell. Physiol. 63, 157-164 (1964)

78) Katz, A.M.
Physiology of the heart, pp. 1-24.
New York: Raven Press, 1977

79) Knoll, G., Brdiczka, D.
Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state: dynamic interactions of the boundary membranes.
Biochim. Biophys. Acta 733, 102-110 (1983)

80) Kriz, S.
Im Labor von S. Kriz, Zürich, im April 1985 durchgeführte Geschwindigkeitsmessungen der handbetriebenen Immersion unter denjenigen der vorliegenden Arbeit analogen Bedingungen ergaben Werte von 3-5 m/sec.

81) Kuroiwa, T., Kawaho, S., Nishibayashi, S., Sato, C.
Epifluorescent microscopic evidence for maternal inheritance of chloroplast DNA.
Nature 298, 481-483 (1982)

82) Kushida, H.
A study of cellular swelling and shrinkage during fixation, dehydration and embedding in various standard media.
J. Electron Microsc. 11, 135-138 (1962)

83) Lambert, C.C., Lambert, G.
Mitochondrial movement during the Ascidian sperm reaction.
Gamete Res. 8, 295-307 (1983)

84) Lancelle, S.A., Callaham, D.A., Hepler, P.K.
A method for rapid freeze fixation of plant cells.
Protoplasma 131, 153-165 (1986)

85) Lancelle, S.A., Torrey, J.G., Hepler, P.K., Callaham, D.A.
Ultrastructure of freeze-substituted Frankia strain HFPCcI3, the actinomycete isolated from root nodules of Casuarina cunninghamiana.
Protoplasma 127, 64-72 (1985)

86) Langenberg, W.G.
Relative speed of fixation of glutaraldehyde and osmic acid in plant cells measured by grana appearence in chloroplasts.
Protoplasma 94, 167-173 (1978)

87) Lee, R.M.K.W.
A critical appraisal of the effects of fixation, dehydration and embedding on cell volume.
in: Science of biological specimen preparation for microscopy and microanalysis, pp. 61-70.
Revel, J.P., Barnard, T., Haggis, G.H., eds.
Chicago: SEM Inc., AMF'OHare, 1984

88) Leedale, G.F., Buetow, D.E.
Observations on the mitochondrial reticulum in living Euglena gracilis.
Cytobiologie 1, 195-202 (1970)

89) LeFurgey, A., Ingram, P., Henry, S.C., Murphy, E., Liebermann, M.
Three-dimensional configuration of the mitochondria in cultured heart cells.
in: Scanning electron microscopy of cells in culture, pp. 293-303.
Bell, P.B., ed.
Chicago: SEM Inc., AMF O'Hare, 1983

90) Levine, R.P., Ebersold, W.T.
The genetics and cytology of Chlamydomonas.
Ann. Rev. Microbiol. 14, 197-216 (1960)

91) Lewin, R.A.
The primary zygote membrane in Chlamydomonas.
J. Gen. Microbiol. 6, 249-250 (1952)

92) Lewin, R.A.
The zygote of Chlamydomonas moewusii.
Can. J. Bot. 35, 795-807 (1957)

93) Lockhausen, J., Kristen, U.
Effects of cytochalasin B on the mitochondria and the golgi apparatus in ovary gland cells of Aptenia cordifolia.
Z. Pflanzenphysiol. 110, 191-199 (1983)

94) Loppes, R.
Damage induced by methyl-methansulfonate (MMS) in Chlamydomonas reinhardi.
Z. Vererbungslehre 98, 193-202 (1966)

95) Loppes, R.
A new class of arginine-requiring mutants in Chlamydomonas reinhardi.
Mol. Gen. Genet. 104, 172-177 (1969)

96) Malhotra, S.K.
A study of structure of the mitochondrial membrane system.
J. Ultrastruct. Res. 15, 14-37 (1966)

97) Malhotra, S.K., Van Harreveld, A.
Some structural features of mitochondria in tissue prepeared by freeze-substitution.
J. Ultrastruct. Res. 12, 473-487 (1965)

98) Manuelidis, E.E.
Pathological swelling and vacuolization of cells.
in: Frontiers of cytology, pp. 417-446.
Palay, S.L., ed.
New Haven: Yole Univ. Press, 1958

99) Martz, D., Lasek, R.J., Brady, S.T., Allen, R.D.
Mitochondrial motility in axons: membranous organelles may interact with the force generating system through multiple surface binding sites.
Cell Motility 4, 89-101 (1984)

100) Mathieu, D., Claasen, H., Weibel, E.R.
Differential effect of glutaraldehyde and buffer osmolarity on cell dimensions: a study of lung tissue.
J. Ultrastruct. Res. 63, 20-34 (1978)

101) McKerracher, L.J., Heath, I.B.
Microtubules around migrating nuclei in conventionally fixed and freeze-substituted cells.
Protoplasma 125, 162-172 (1985)

102) Mersey, B., McCully, E.
Monitoring of the course of fixation of plant cells.
J. Microsc. 114, 49-76 (1983)

103) Minami, S.A., Goodenough, U.W.
Novel glycopolypeptide synthesis induced by gametic cell fusion in Chlamydomonas reinhardi.
J. Cell Biol. 77, 165-181 (1978)

104) Müller, M.
Elektronenmikroskopische Techniken auf der Basis der Gefrierfixation.
in: Jahrbuch der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft, wissenschaftlicher Teil, pp. 34-39, 1979.

105) Müller,M.
Demonstration of liposomes by electron microscopy.
in: membrane proteins, pp. 252-256.
Azzi, A., Brodbeck, U., Zahler, P., eds.
Heidelberg: Springer-Verlag, 1981

106) Müller, M., Marti, Th., Kriz, S.
Improved structural preservation by freeze-substitution.
in: Electron Microscopy 1980, vol. 2, pp. 720-721,
Seventh European Congress on Electron Microscopy Foundation, Leiden (1980).
Brederoo,P., de Priester, W., eds.

107) Osafune, T.
Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of Euglena gracilis (Z.) in synchronous culture.
J. Electron Microsc. 22, 51-61 (1973)

108) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Electron microscope studies on the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardi Dangeard in synchronous culture. I. Some characteristics of changes in subcellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria.
Plant Cell Physiol. 13, 211-227 (1972a)

109) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardi Dangeard in synchronous culture. II. Association of mitochondria and the chloroplast at an early developmental stage.
Plant Cell Physiol. 13, 981-989 (1972b)

110) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardi Dangeard in synchronous culture. III. Three-dimensional structures of mitochondria in the cells at intermediate stages of the growth phase of the cell cycle.
J. Electron Microsc. 24, 247-252 (1975a)

111) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of Euglena gracilis Z. in synchronous culture.
I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells.
Plant Cell Physiol. 16, 313-326 (1975a)

112) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of Euglena gracilis Z. in synchronous culture.
III. Three-dimensional structure of mitochondria after division of giant forms.
J. Electron Microsc. 24, 283-286 (1975b)

113) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E., Okhuro, I.
Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of Chlamydomonas reinhardi (Dangeard) in synchronous culture. IV. Mitochondria in dividing cells.
J. Electron Microsc. 25, 261-270 (1976)

114) Pellegrini, M.
Three-dimensional reconstruction of organelles in Euglena gracilis Z.
J. Cell Sci. 43, 137-166 (1980)

115) Perner, P.F., Pfefferkorn, G.
Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderungen bei der Isolierung.
Flora 140, 98-129 (1953)

116) Plattner, H., Bachman, L.
Cryofixation: a tool in biological ultrastructural research.
Int. Rev. Cytol. 79, 237-304 (1982)

117) Pryde, J.A., Jones, G.O.
Properties of vitreous water
Nature 170, 685-688 (1952)

118) Rebhuhn, L.I.
Freeze-substitution and freeze-drying.
in: Principles and techniques for electron microscopy, vol. 2, pp. 3-49.
Hayat, M.A., ed.
New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1972

119) Reger, J.F., Escaig, F., Pochon-Masson, J., Fitzgerald, M.E.C.
Observations on crab, Carcinus maenas, spermatozoa following rapid-freeze and conventional fixation technique.
J. Ultrastruct. Res. 89, 12-22 (1984)

120) Ritchie, D., Hazeltine, D.
Mitochondria in Allomyces under experimental conditions.
Exp. Cell Res. 5, 261-274 (1953)

121) Roberts, A.S.
Changes in mitochondrial form.
Anat. Rec. 104, 163-183 (1949)

122) Ryan, R.S., Grant, D., Chiang, K.S., Swift, H.
Isolation of mitochondria and characterization of mitochondrial DNA from Chlamydomonas reinhardtii.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3268-3272 (1978)

123) Sager, R.
Inheritance in the green alga Chlamydomonas reinhardi.
Genetics 40, 476-489 (1955)

124) Sager, R., Granick, S.
Nutritional control of sexuality in Chlamydomonas reinhardi.
J. Gen. Physiol. 37, 729-742 (1954)

125) Sager, R., Ishida, M.R.
Chloroplast DNA in Chlamydomonas.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 50, 725-730 (1963)

126) Sager, R., Lane, D.
Molecular basis of maternal inheritance.
Proc. Natl. Acad. Sci USA 69, 2410-2413 (1972)

127) Salmeen, I., Zachmanidis, P., Jesion, G., Feldkamp, L.A.
Motion of mitochondria in cultured cells quantified by analysis of digitized images.
Biophys. J. 48, 681-686 (1985)

128) Sandoz, D., Nicolas, G., Laine, M-C.
Two mucous cell types revisited after quick-freezing and cryosubstitution.
Biol. Cell. 54, 79-88 (1985)

129) Schantz, R., Pellegrini, M.
Correlations between mitochondrial and plastid structure in Euglena gracilis.
in: Acides nucléiques et synthèse protéique chez les végétaux. Colloques internationaux du C.N.R.S., no. 261, Strasbourg, 15-24 Juillet 1976, pp. 159-166.
1976-1977

130) Schliwa, M.
Mechanism of intracellular organelle transport.
in: Cell and muscle motility, vol. 5, pp. 1-82.
Shay, J.W., ed.
New York, London: Plenum Publishing Corporation, 1984

131) Schötz, F.
Dreidimensionale maßstabsgetreue Rekonstruktion einer grünen Flagellatenzelle nach Elektronenmikroskopie von Serienschnitten.
Planta 102, 152-159 (1972)

132) Schötz, F., Batheld, H., Arnold, C.G., Schimmer, O.
Die Organisation und Architektur der Chlamydomonas-Zelle. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Serienschnitten und der daraus resultierenden dreidimensionalen Rekonstruktion.
Protoplasma 75, 229-254 (1972)

133) Semino, G.A., Restani, P., Cerletti, P.
Effect of bound carbohydrate on the action of trypsin on Lupin seed glycoproteins.
J. Agric. Food Chem. 33, 196-199 (1985)

134) Simatos, T., Turc, J.M.
Fundamentals of freezing in biological systems.
in: Freeze.drying and advanced food technology, pp. 17-28.
Goldblick, K., Rey, J., Rothmeyer, P., eds.
London, New York: Academic Press, 1975

135) Sitte, H.
Morphometrische Untersuchungen an Zellen.
in: Proceedings of the symposium on quantitative methods in morphology, pp. 167-198.
Weibel, E.R., Elias, H., eds.
Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1967

136) Sitte, H.
Kryopräparationsmethoden im Rahmen der Ultramikrotomie.
in: Information Reichert-Jung, pp. 1-24, Lehrgang Nr. 4763/02.146, "Moderne Präparationsmethoden biologischer Objekte für die Elektronenmikroskopie"
Esslingen: Technische Akademie, 5.-7. November 1980

137) Sitte, H.
Kryopräparation in der Mikroskopie, 1. und 2. Teil.
Labor-Praxis, pp. 812-823, 960-973.
Juli/August, September 1982

138) Sitte, H., Fell, H., Hölbl, W., Kleber, H., Neumann, K.
Fast freezing device.
J. Microsc. 111, 35-38 (1977)

139) Sjöstrand, F.S.
The problems of preserving molecular structure of cell components in connection with electron microscopic analysis.
J. Ultrastruct. Res. 55, 271-280 (1976)

140) Sjöstrand, F.S., Bernhard, W.
The structure of mitochondrial membranes in frozen sections.
J. Ultrastruct. Res. 56, 233-246 (1976)

141) Spurr, A.R.
A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43 (1969)

142) Steinbrecht, R.A.
Cryofixation without cryoprotectants. Freeze substitution and freeze etching of an insect olfactory receptor.
Tissue and Cell 12, 73-100 (1980)

143) Steinbrecht, R.A.
Experiments on freezing damage with freeze substitution using moth antennae as test objects.
J. Microsc. 125, 187-192 (1982)

144) Steinbrecht, R.A.
Recrystallization and ice-crystal growth in a biological specimen, as shown by a simple freeze substitution method.
J. Microsc. 140, 41-46 (1985)

145) Steinbrecht, R.A.
ATP-ase particles (portasomes) on mitochondrial christae and the plasma membrane of an insect as demonstrated by freeze-substitutiton.
Naturwissenschaften 73, 275-276 (1986)

146) Steinbrecht, R.A., Müller, B.
Experiments on artifacts with cryofixation of silkmoth antennae - effects of OsO_4-prefixation, glycerol and premature thawing.
in: Electron Microscopy 1980, vol. 2, pp. 738-739, Seventh European Congress on Electron Microscopy Foundation, Leiden (1980).
Brederoo, P., de Priester, W., eds.

147) Stevens, B.J.
Variation du nombre de mitochondries et du volume du chondriome de la levure selon les conditions de croissance.
J. Microscopie 20, 90-91 (1974)

148) Stevens, B.J.
Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computer graphics reconstitution.
Biol. Cell 28, 37-56 (1977)

149) Summerhayes, I., Wong, D., Chen, L.B.
Effects of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution.
J. Cell Sci. 61, 87-107 (1983)

150) Tanaka, K., Kanbe,T., Kuroiwa, T.
Three-dimensional behaviour of mitochondria during cell division and germ tube formation in the dimorphic yeast Candida albicans.
J. Cell Sci. 73, 207-220 (1985)

151) Tiwari, S.C., Wick, S.M., Williamson, R.E., Gunning, B.E.S.
Cytosceleton and integration of cellular function in cells of higher plants.
J. Cell Biol. 99, 63s-69s (1984)

152) Triemer, R.E., Brown, R.M.
Ultrastructure of meiosis in Chlamydomonas reinhardtii.
Br. Phycol. J. 12, 23-44 (1976)

153) Trump, B.F., Bulger, R.E.
New ultrastructural characteristics of cells fixed in glutaraldehyde-osmiumtetroxide mixture.
Lab. Invest. 15, 368-379 (1966)

154) Trump, B.F., Ericsson, J.L.E.
The effect of the fixative solution on the ultrastructure of cells and tissues.
Lab. Invest. 14, 507-585 (1965)

155) Ueda, K., Noguchi, T.
Structure of dictyosomes in Scenedesmus acuminatus observed by the freeze-substitution method.
J. Cell Sci. 82, 217-222 (1986)

156) Van Harreveld, A., Crowell, J.
Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation.
Anat. Rec. 149, 381-385 (1964)

157) Van Harreveld, A., Crowell, J., Malhotra, S.K.
A study of extracellular space in central nervous tissue by freeze substitution.
J. Cell Biol. 25, 117-137 (1965)

158) Van Venetie, R., Verkleij, A.J.
Possible role of non-bilayer lipids in the structure of mitochondria. A freeze-fracture electron microscopy study.
Biochim. Biophys. Acta 692, 397-405 (1982)

159) Van Winkle-Swift, K.P.
Maturation of algal zygotes: alternative experimental approaches for Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae).
J. Phycol. 13, 225-231 (1977)

160) Van Winkle-Swift, K.P., Burrascano, C.G.
Complementation and preliminary linkage analysis of zygote maturation mutants of the homothallic alga, Chlamydomonas monoica.
Genetics 103, 429-445 (1983)

161) Venables, J.H., Coggeshall, R.
A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy.
J. Cell Biol. 25, 407-408 (1965)

162) Völcker, W., Meschede, H., Weil, J., Thurm, K.
Immersion-freezing and freeze-substitution of irregularly shaped specimens with the aid of a cryoinjector.
Mikroskopie (Wien) 41, 351-359 (1984)

163) Weast, R.C., Astle, M.J., Beyer, W.H., eds.
in: Handbook of Chemistry and Physics, 56th Edition, D-237.
Boca Raton: CRC-Press, Inc., 1975-1976

164) Weibull, C., Christiansson, A., Carlemalm, E.
Extraction of membrane lipids during fixation, dehydration and embedding of Acholeplasma laidlawii-cells for electron microscopy.
J. Microsc. 129, 201-205 (1983)

Zweiter Teil

Anhang mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Abb. 1 - 4 erläutern die Einfrierapparatur zur Kryofixierung

Abb. 1: Immersionsapparatur (Übersicht) in Arbeitsstellung kurz vor dem Einfrieren.
Auf dem Magnetrührer befindliche Styropor-Box (Deckel fehlt) ist mit NL befüllt. In ihr ist der Messingzylinder mit Flüssigpropan (nicht sichtbar) plaziert. Die Messingstange mit dem Präparat am unteren Ende (vgl. Abb.1) ist aus dem Führungsrohr herausgezogen (vgl. Abb.3). Links das Digitalthermometer technoterm^{R} 9400, dessen Fühler in die kalte Stickstoffgas-Atmosphäre hineinreicht, um dort laufend die Temperatur zu überwachen.

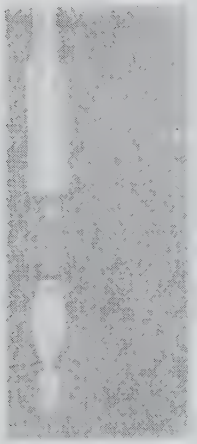
Abb. 2: Präparatanordnung
Am unteren Ende der Messingstange wird über einen Adapter eine Tuschefeder aufgesteckt, welche mit ihrer Spitze ein Sandwich-Netzgrid pinzettenartig festhält. Auf die untere Hälfte dieses Grids wird ein kleines Stück Zygotenhaut zentrisch plaziert. Das Grid wird während der Präparation nicht zusammengeklappt!
Teilstrich = 1 cm;

Abb. 3: Arbeitsstellung kurz vor dem Einfrieren
Die Messingstange mit der daran fixierten Schlauchklemme ist noch aus dem Führungsrohr herausgezogen.
Der (in praxi) größere Abstand zwischen Schlauchklemme und Führungsrohr entspricht der Länge der Immersionsstrecke.

Abb. 4: Arbeitsstellung am Ende der Immersion
Beim Herunterdrücken der Messingstange hat die Schlauchklemme am Führungsrohr angeschlagen und beendet dadurch den Tauchweg des Präparates ins Kryogen.

1

2



3

4

Abb. 5 und 6: Zwei typische auf Agarplatten gereifte sechs Tage alte Chlamydomonas-Zygoten

---

Präparation: Trypsin 0,3% / 5 min / 37°C (nur Abb.6!)
Acrolein 5% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer Sörensen-Phosphat 50 mmol

Auf Agar kultivierte Zygoten besitzen selten Kugelform. Ihre Konturen erweisen sich meist ziemlich zerklüftet.

Die mächtige Zygotenwand besteht aus mindestens fünf Schichten.

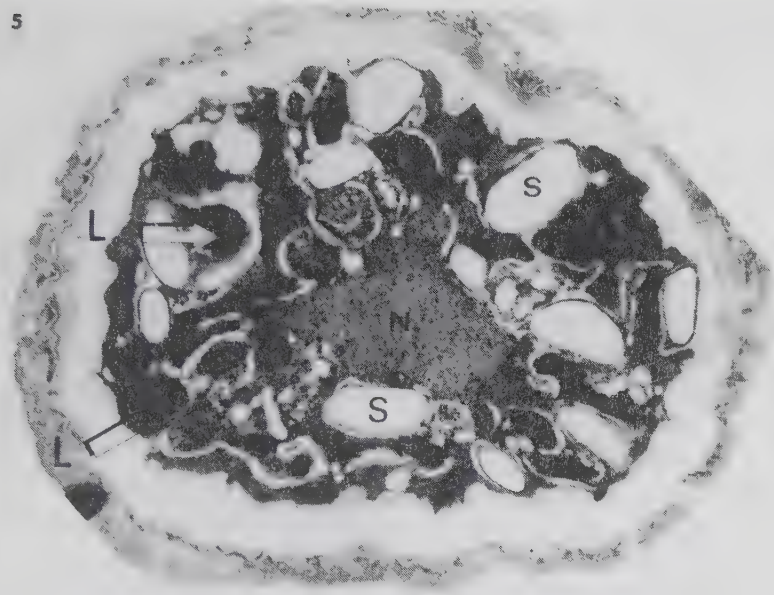
Das dichte Cytoplasma zeigt keine Membranen. Es enthält viele Stärkegranula (S) und Lipidkörper (L).

Die mit Ausnahme der Stärkegranula nur geringfügigen Kontrastunterschiede im Zygoteninneren erlauben es nicht, Organelle zu identifizieren.

N = vermutlich Zellkern
Plastide völlig entdifferenziert
Mitochondrien unauffindbar

Vergrößerung: Abb.5: 18 600 x
Abb.6: 16 560 x

5



6

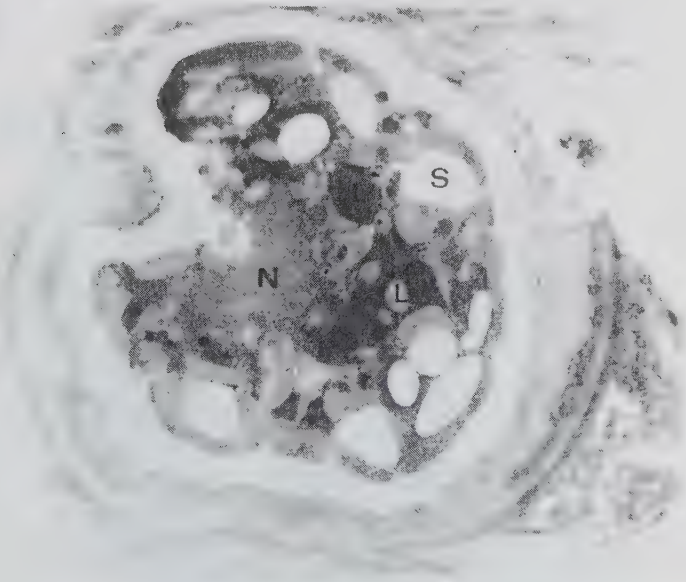


Abb. 7 - 9 zeigen die bei der chemischen Fixierung des Häutchens stets zu beobachtenden drei verschiedenen Zygotentypen

Fixation: GA 2% / 24 Std.
OS 1% / 4 Std.
Puffer HEPES 10 mmol

Vergrößerungen:
Abb. 7: 14 800 x
Abb. 8: 16 400 x
Abb. 9: 20 500 x

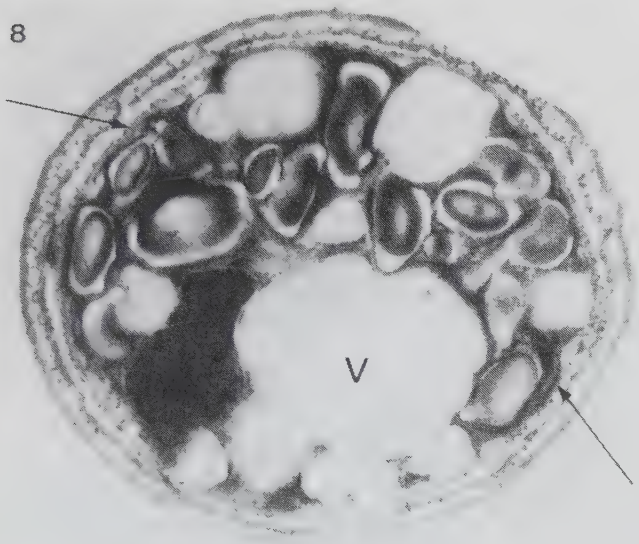
Abb. 7: Platten-Typ (vgl. Abb.5,6)
Das entdifferenzierte Cytoplasma ist mit Stärkegranula (hier dunkel), kleinen und großen Lipidtropfen (L) und größeren Einschlüssen (E) besetzt. Membranen fehlen.

Abb. 8: Vakuolen-Typ
Der Intrazellularraum enthält eine große Vakuole (V). Das weniger entdifferenzierte Cytoplasma zeigt vereinzelt Plastidenmembranen (Pfeil). Der Zellkern besitzt einen Nukleolus.

Abb. 9: Differenzierter Typ (am häufigsten)
Nur auf ihn wird in den weiteren Untersuchungen eingegangen. Man erkennt den Plastidengürtel mit den Thylakoidmembranen, die offensichtlich durch die lange Fixierungszeit geschädigt sind, Zellkern (N) mit Nukleolus und Kernmembran, Golgi-Apparat (G), extrahierte Einschlüsse (E) und Mitochondrienanschnitte (M). Die Konturen der Mitochondrien sind unklar, ihre Matrix ist ausgebleicht. Die Cristae zeigen sich meist nur diffus.

7

8



9

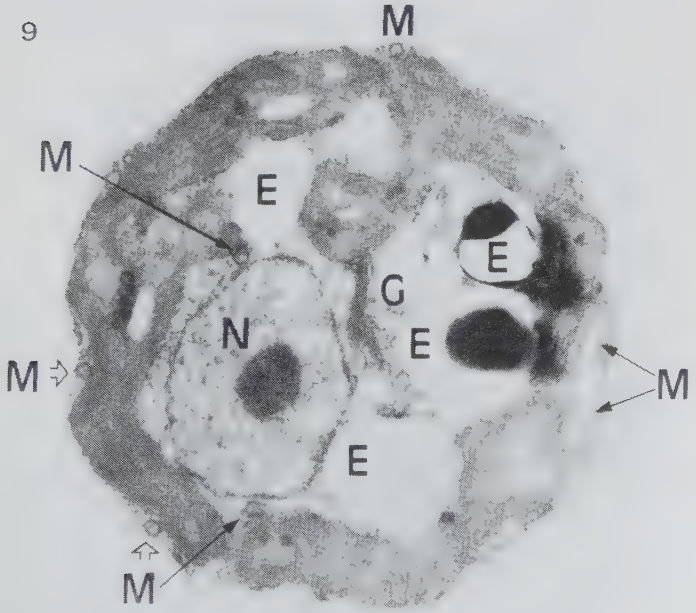


Abb. 10 - 12 stellen drei weitere OHNE VORBEHANDLUNG fixierte Zygoten vor

---

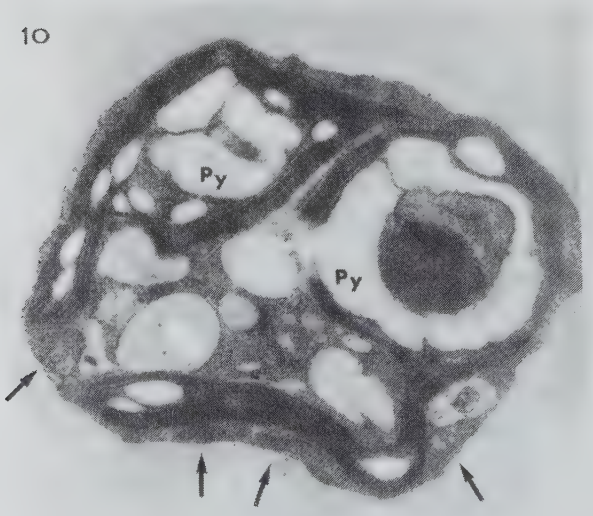
Fixierung: GA 2% / 12 Std.
OS 1% / 4 Std.
Gerbsäure 2% / 2 Std. (nur bei Abb. 11 und 12)
Puffer HEPES 10 mmol

Vergrößerungen:
Abb. 10: 19 500 x
Abb. 11: 16 200 x
Abb. 12: 16 200 x

Abb. 10: Durch Schrumpfung hat sich der Protoplast von der Zellwand abgelöst. Die Plastide mit gut erkennbaren Thylakoidmembranen enthält zwei Pyrenoide (PY). Teilweise geschädigte Mitochondrien sind nur schwer zu identifizieren (Pfeile).

Abb. 11: Auch nach Gerbsäuredrittfixation erscheinen die Mitochondrienkonturen nicht klarer (Pfeile).
Die Zygote enthält zwei Pyrenoide (PY).

Abb. 12: Diese Zygote enthält untypischerweise sogar drei Pyrenoide (PY)! Einschlußkörper, der nicht extrahiert wurde, besteht vermutlich aus unlöslichem, nicht sezerniertem Zellwandmaterial (E).
Anmerkung: Die Falten am Rand dieser Zelle rühren von einem Schaden der Lochfolie her.



11

12

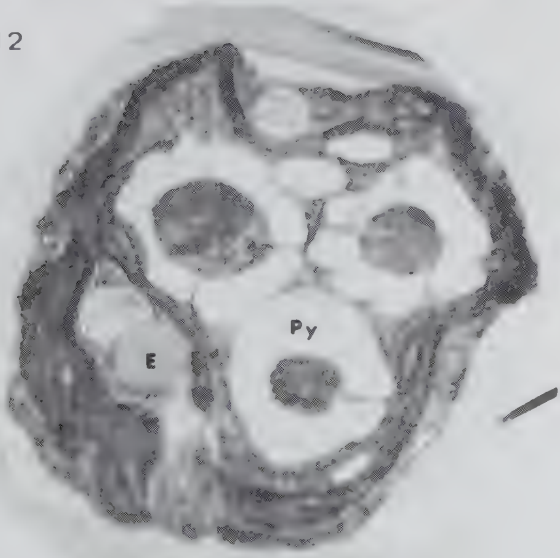


Abb. 13 und 14 dokumentieren exemplarisch die äußerst schlechte Strukturerhaltung nach TRYPSINVORBEHANDLUNG bei RAUMTEMPERATUR

Auch deutlich unterschiedliche Enzymkonzentration und Reaktionszeit führen zu keiner korrelierbaren Verbesserung bzw. Verschlechterung der Fixierungsqualität.

Abb. 13: Präparation: Trypsin 0,3% / 1 min / RT
GA 4% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer Collidin 50 mmol

Der Zellkern (N) ist stark geschrumpft.

Man erkennt nur noch bizarr geformte Mitochondrienreste (M).

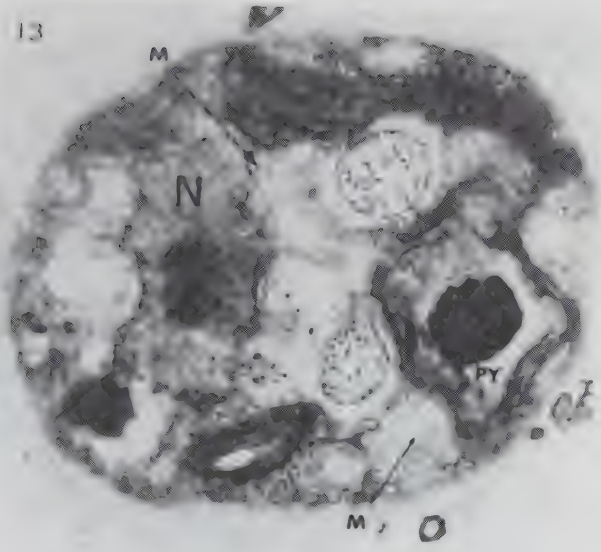
Das Pyrenoid (PY) ist ebenfalls schwer geschädigt.

Abb. 14: Präparation: Trypsin 0,4% / 2 min / RT
GA 4% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer Collidin 50 mmol

Stark aufgeblähte Mitochondrien (M) zeigen nur noch in ihrer Peripherie Cristaerudimente.

Weitere cytoplasmatische Strukturen (*), die entweder Mitochondrien oder Teile der Plastide darstellen könnten, sind nicht identifizierbar.

Vergrößerung: Abb. 13: 20 000 x
Abb. 14: 18 000 x


13
M
N
PY
M
O

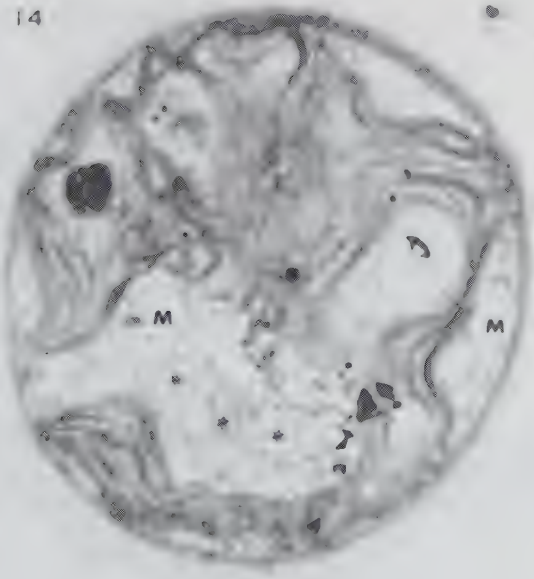

14
M
M

Abb. 15 und 16 werden als Beispiele für die strukturschädigenden Effekte der COCKTAIL-Fixierung nach unterschiedlicher TRYPSINVORBEHANDLUNG bei RAUMTEMPERATUR gezeigt

---

Abb. 15: Präparation: Trypsin 0,4% / 1 min / RT
GA 1% + OS 2% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer Collidin 50 mmol

Die Cytoplasmamatrix ist extrahiert, der Zellkern zusammengeschrumpft.

Die schwer geschädigten Mitochondrien zeigen sich stark gequollen und ausgewaschen (*). Ihre Cristae sind an die Organellenperipherie gedrängt.

Im Cytoplasma befinden sich Membranbruchstücke, die vermutlich von Golgi-Apparaten stammen (Pfeile).

E = unlösliche Einschlußverbindung.

Vergrößerung: 15 600 x

Abb. 16: Präparation: Trypsin 0,3% / 1 min / RT
GA 2% + OS 2% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer Collidin 50 mmol

Selbst die Plastidenstrukturen (PL) samt Pyrenoid erscheinen verschmiert und sehr schlecht fixiert.

Die angeschwollenen Mitochondrienprofile (M) sind vereinzelt geplatzt (Pfeile). Manche Anschnitte (Pfeilspitzen) konnten nicht identifiziert werden.

E = unlösliche Inkrustierung

Vergrößerung: 20 000 x

Der feinkörnige elektronendichte Niederschlag ist eine Begleiterscheinung der COCKTAIL-Fixierung und entsteht vermutlich durch Reaktion zwischen den Komponenten der Fixierlösung.

15

16

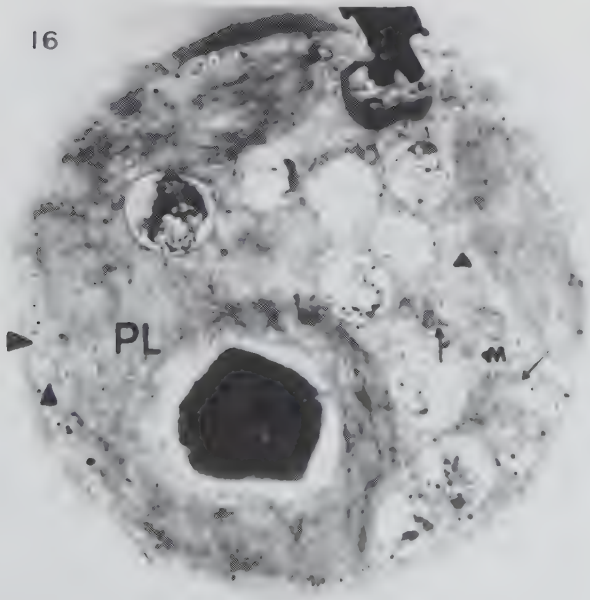


Abb. 17 und 18 zeigen das typische Zellbild nach KALIUMPERMANGANAT-Fixierung

Das Cytoplasma wird mit Ausnahme der Membranen selektiv extrahiert, der resultierende starke Kontrast enthüllt schwerste Organellenschädigung.

Präparation: Trypsin 0,3% / 1 min / RT
GA 2% / 2 Std. in Collidinpuffer 50 mmol
$KMnO_4$ 2% / 1 Std. in N-MM

Abb. 17: Der Zellkern (N) ist geschrumpft, aber die Kernporen unnatürlich geweitet (*).

Die membranbegrenzten Vakuolen sind geplatzt.

Nur noch anhand der Doppelmembran sind die angeschwollenen Gebilde als Mitochondrien (M) zu identifizieren.

G = Golgi-Dictyosomen

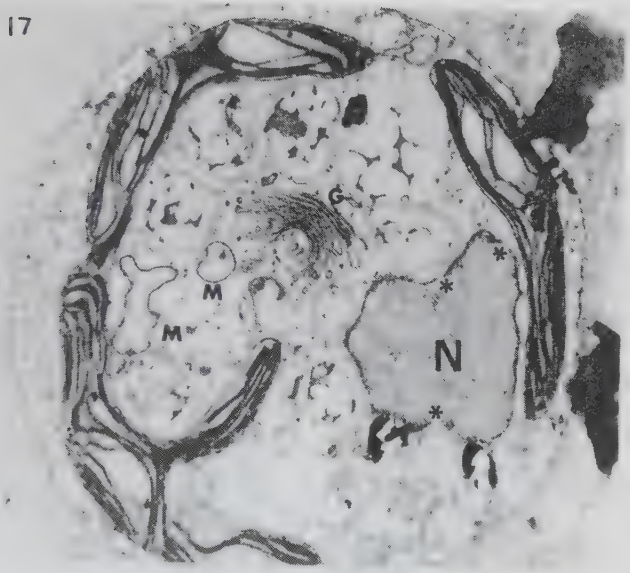
Vergrößerung: 22 500 x

Abb. 18: Die Zygote enthält zwei Pyrenoide (PY).

Ihre Mitochondrienmatrix wurde völlig extrahiert (Pfeile). Die Organelle besitzen unnatürliche Formen.

Vergrößerung: 15 190 x

17



18

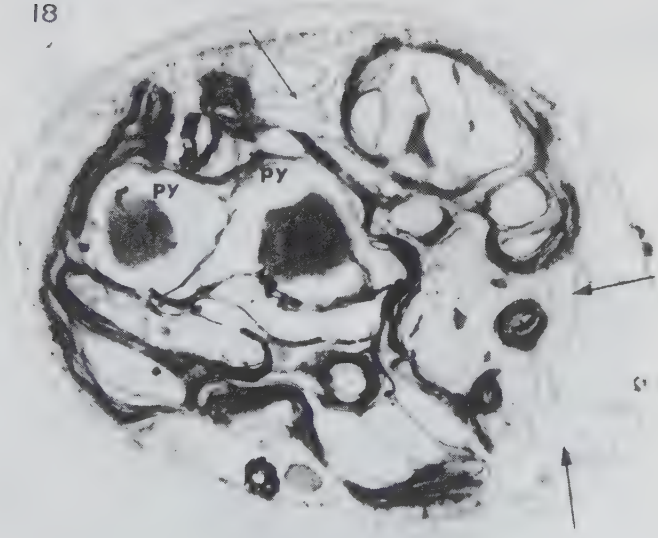


Abb. 19 - 21 zeigen beispielhaft die deutlich bessere Strukturerhaltung nach TRYPSINBEHANDLUNG bei 37°C

Präparation: Trypsin 0,3% / 2 min / 37°C
GA 2% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer HEPES 10 mmol

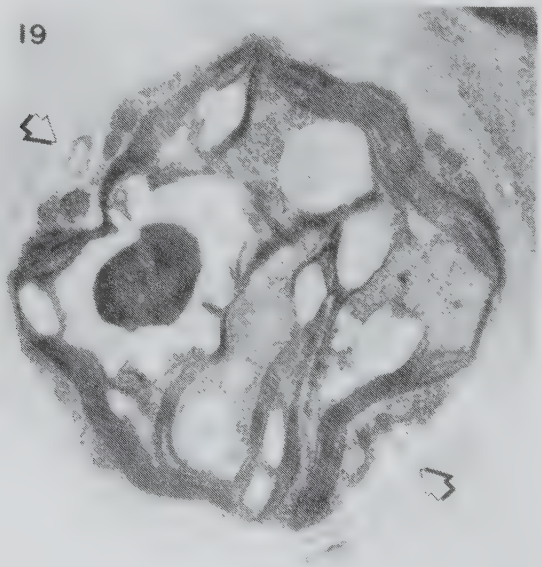
Vergrößerung: Abb.19: 17 200x
Abb.20: 21 200x
Abb.21: 20 500x

Am Zellkern und vereinzelt am Protoplasten erkennt man Anzeichen von Schrumpfung (Pfeile). Der Erhaltungszustand der Plastide ist gut.

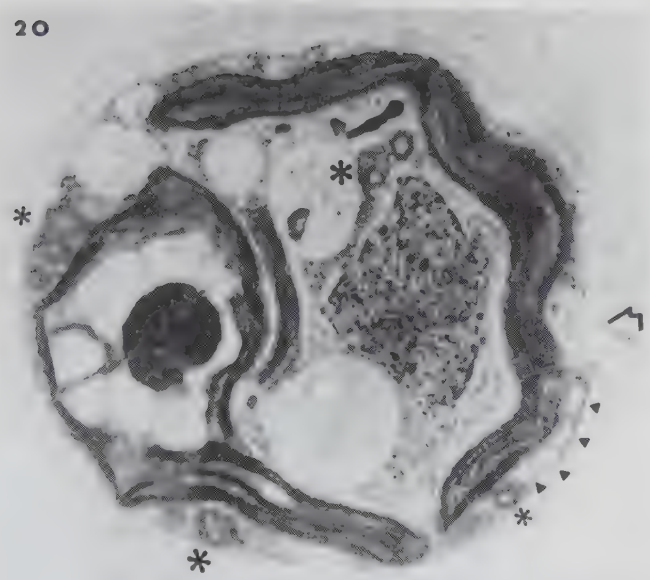
Die Mitochondrienmatrix erweist sich zwar wenig extrahiert, jedoch sind die Cristae nicht klar definierbar. Liegen Mitochondrienanschnitte in enger Nachbarschaft zueinander, dann können ihre Konturen nicht immer eindeutig identifiziert werden.

Einige Mitochondrienprofile zeigen lokale Aufhellungen (siehe * Abb.20), die Anzeichen eines beginnenden Mitochondrienzerfalles sein können. Die perlschnurartig aneinandergereihten kleinen Kavitäten (Abb.20 Pfeilspitzen) sind möglicherweise das Ergebnis eines bereits fortgeschrittenen Mitochondrienzerfalles.

Abbildung 21 zeigt einen Zellanschnitt, der vier Einschlußgebilde (E) mit homogenem Inhalt vorweist.



20



21

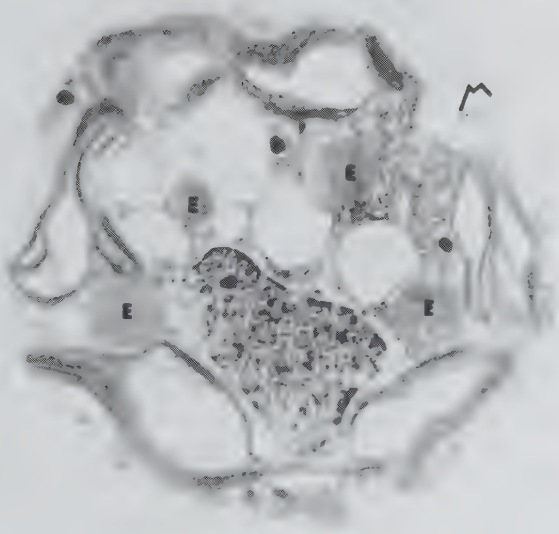


Abb. 22 - 25: Das Ergebnis der kombinierten Vorbehandlung aus SCHÜTTELN und TRYPSINDIGESTION bei 37°C

Die teilweise gute Strukturerhaltung ist vermutlich nicht auf das SCHÜTTELN, sondern auf die TRYPSINBEHANDLUNG zurückzuführen.

Trotz Schütteln sind die Zygoten nach wie vor im Verband in die Häutchenmatrix eingebettet, deren fibrilläre Struktur um die Zygoten herum gut sichtbar ist.

Präparation: SCH 48 Stunden lang nach dem Kreuzen
Abb. 22 - 24: Trypsin 0,3% / 2 min / 37°C
Abb. 25: Trypsin 0,3% / 15 min / 37°C
GA 2% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Puffer HEPES 10 mmol

Abb. 22: Zygote mit "normaler" cytoplasmatischer Strukturierung, erkennbar an Position und Struktur des Zellkernes und an den geordneten Plastidenstrukturen. Vergrößerung: 18 500 x

Abb. 23 - 25: Zygoten mit abweichender Innenarchitektur, die vermutlich ein Effekt des Schüttelns ist.

Abb. 23: Die Plastide mit ihren ungeordneten Thylakoidstrukturen füllt fast den gesamten Zygoteninnenraum aus.

Der Zellkern mit seinem stark kondensierten Karyoplasma wurde in die Zellperipherie gedrängt.

Beachte nebeneinanderliegende Mitochondrienanschnitte von unterschiedlicher Fixierungsqualität (Pfeile).

Vergrößerung: 16 000 x

22

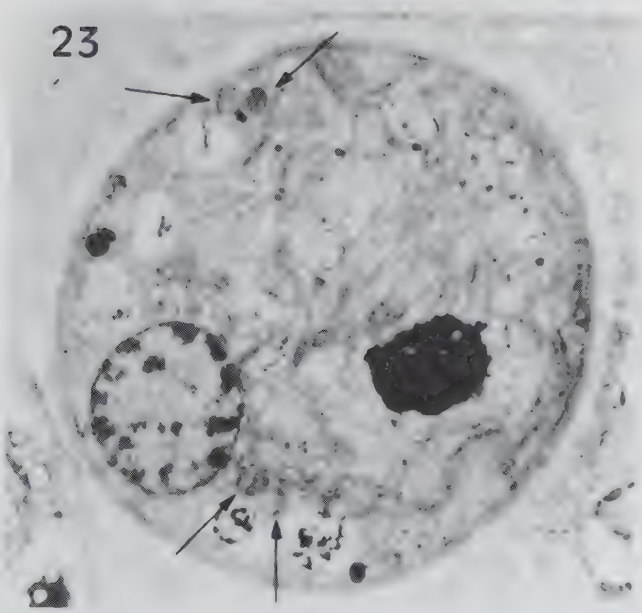

23

Abb. 24: Ein großer Einschlußkörper, der von keiner Membran umgeben ist, ist neben dem Zellkern anzutreffen (E).

M = Mitochondrienprofil mit ungewöhnlich großem Durchmesser;

Beachte das stark kondensierte Karyoplasma des in die Zellperipherie verdrängten Kernes.

Plastide analog Abb.23!

Vergrößerung: 20 000 x

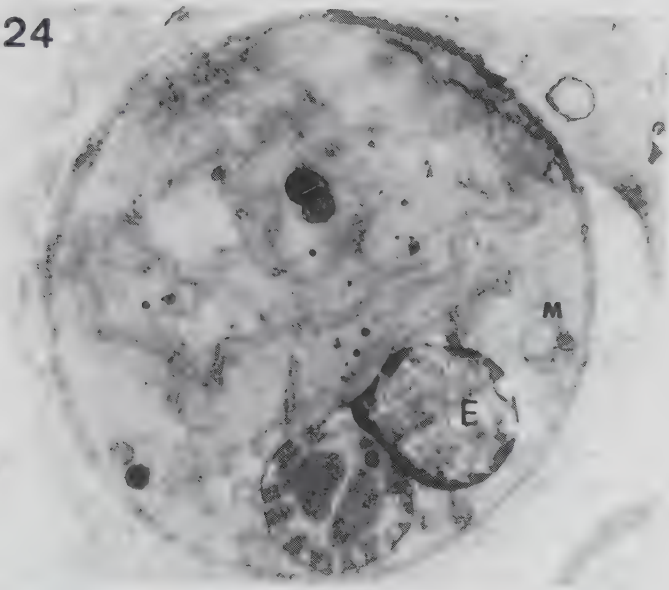
Abb. 25: Zygote nach 15-minütiger TRYPSINVORBEHANDLUNG und vorherigem Schütteln

Beachte auch hier die verworrene Plastidenstruktur, die Lokalisation des Zellkernes und dessen Karyoplasmastruktur!

Das Einschlußgebilde (E) dieser Zelle übertrifft in der Größe möglicherweise den Zellkern.

Vergrößerung: 18 500 x

24



25

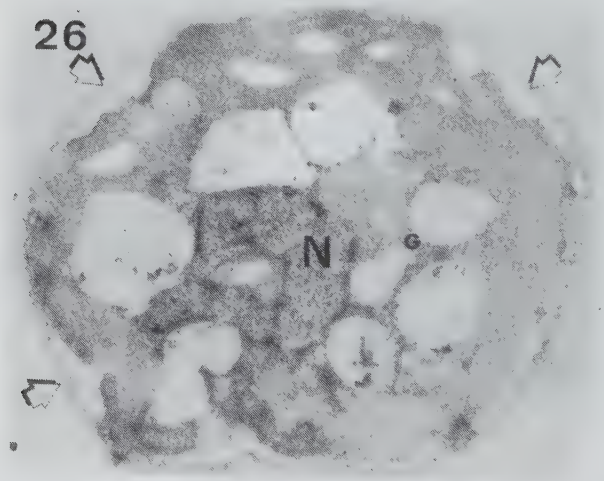
Abb. 26 - 28: Drei repräsentative Beispiele für die ACROLEIN-fixierung der Zygoten

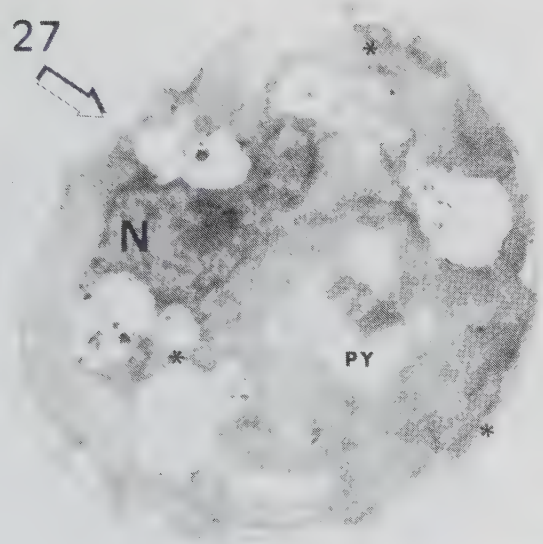
Beachtenswert ist die starke Schrumpfung an Protoplast (Pfeil) und Zellkern (N). Die Thylakoidmembranen und Pyrenoidstrukturen (PY) sind schwer geschädigt. Die Mitochondrien besitzen eine dunkle Matrix, aber unklare Konturen.

Abb. 26: Präparation: Acr. 5% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Vergrößerung: 18 960 x
Beachte die geschädigten Nukleolus- und Golgi-Strukturen (G)!

Abb. 27: Präparation: Acr. 2% + GA 5% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Vergrößerung: 18 960 x
Beachte die schlecht erhaltene Innenstruktur der Mitochondrien (*)!

Abb. 28: Präparation: Trypsin 0,3% / 2 min / 37°C
Acr. 2% + GA 5% / 2 Std.
OS 2% / 2 Std.
Vergrößerung: 20 000 x
Die Zelle zeigt ein gut fixiertes fädig gewundenes Mitochondrium (*) in einem ansonsten nur unbefriedigend erhaltenen Cytoplasma.




27
N
PY

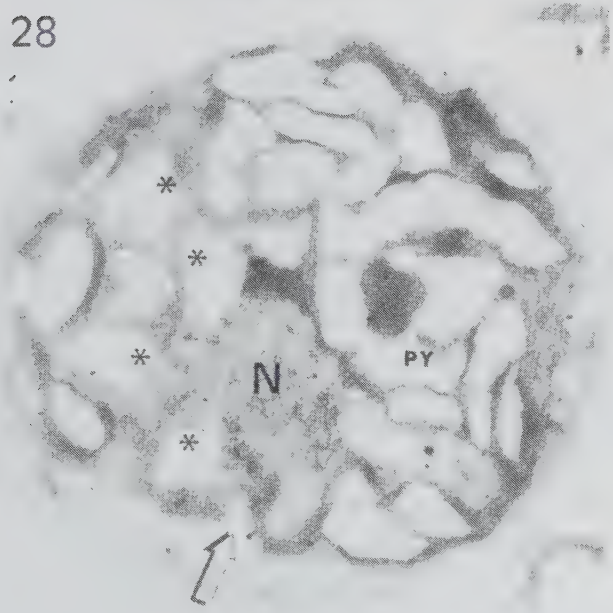

28
N
PY

Abb. 29: Beispiel für ausgeprägtes Eiskristallwachstum mit schwerster Strukturzerstörung

Vor dem Einfrieren wurde kein Medium, welches das Häutchen umgibt, entfernt. Nur Stärkegranula (S) blieben unbeschadet. Vergrößerung: 15 200 x

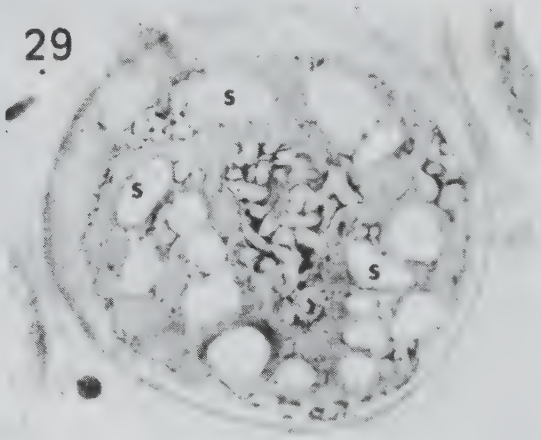


Abb. 30: Nach dem Absaugen des das Häutchen umgebenden überschüssigen Mediums verbesserte sich die Strukturerhaltung

Präparation: KS in Methanol / GA 3% / UAc 0,5% / OS 1%

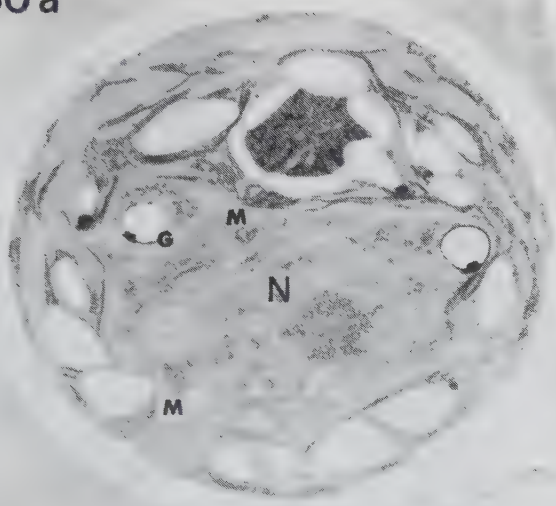
Abb. 30a: KS 14 Tage lang (Schnitt nicht nachkontrastiert)
Vergrößerung: 20 000 x

Abb. 30b: KS drei Tage lang
Vergrößerung: 18 000 x

Das verbesserte Einfrieren ermöglicht erstmals das Erkennen cytoplasmatischer Strukturen: Zellkern (N), Golgi-Apparat (G), Thylakoidmembranen und Mitochondrien (M).

Die lange Substitutionszeit scheint keinen Vorteil zu bringen.

30 a



30 b

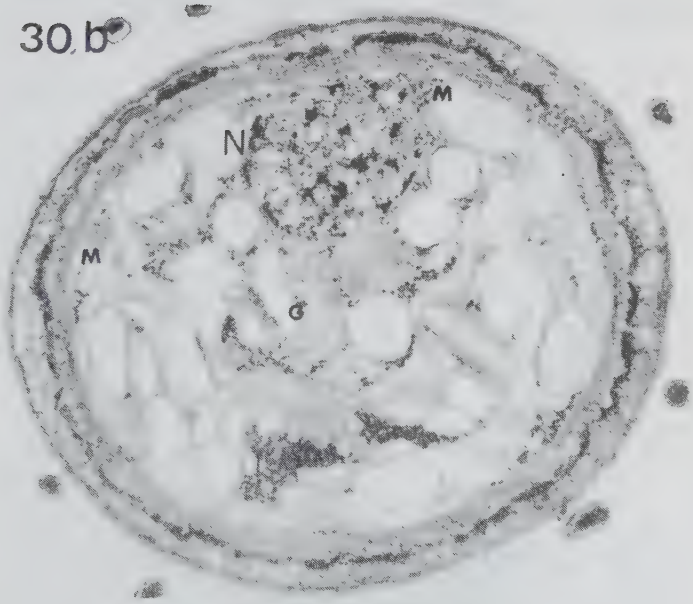


Abb. 31: Wird im Diskussionsteil besprochen.

Die gut gefriersubstituierte Zygote besitzt einen ausgeprägten Zellwandschaden.

Da die cytoplasmatischen Bestandteile (Pfeile) im Augenblick des Einfrierens gerade auszulaufen beginnen, kann der Zellwandschaden nur vor der KF gesetzt worden sein.

Präparation: KS in Aceton / OS 4%

Vergrößerung: 13 950 x

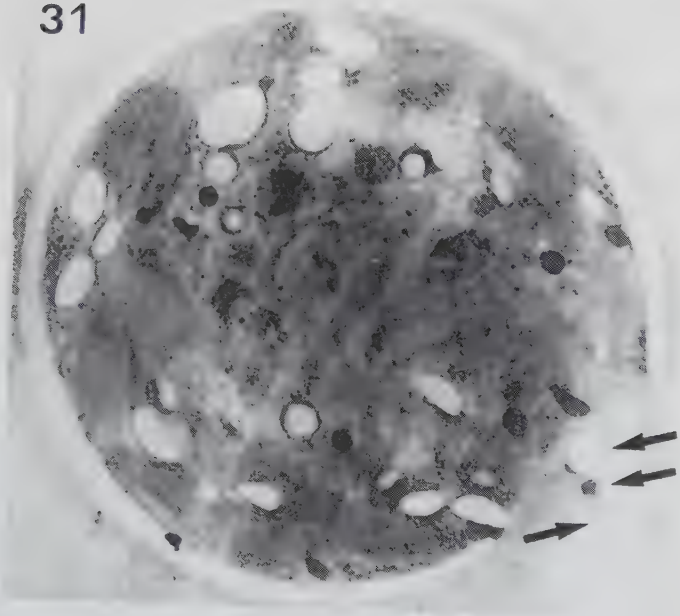
Abb. 32: Erscheinungsbild der meisten Zygoten nach KF-KS

Die Zelle enthält nur noch sehr wenige cytoplasmatische Strukturen, ist aber frei von Eiskristallartefakten (vgl. mit Abb.29).

S = Stärkegranula
PY = Pyrenoid
L = extrahierter Lipidkörper

Vergrößerung: 18 000 x

31



32

Abb. 33: Übersichtsaufnahme des Schnittes einer Schnittserie

Präparation: KS in Aceton / OS 4%
KS-Dauer drei Tage

Vergrößerung: 2 860 x.

Von den 64 beobachtbaren Zygotenanschnitten sind zwei (Pfeil) in der erforderlichen Qualität gefriersubstituiert. Dies entspricht einer ungefähren Ausbeute von 3%.

* Diese intensiv geschwärzten Zygoten sind zwar gut gefriersubstituiert, aber nicht analysierbar. Es sind Zygoten vom Platten-Typ (vgl. auch Abb.35).

Beachte die angebrochenen Zellen (Pfeilspitze)!

Inset: Direkt neben einer Zelle mit hervorragender Strukturerhaltung ist eine mehrfach gebrochene Zygote zu beobachten.

Die Brüche verlaufen anscheinend zwischen Zellwand und Protoplast entlang der Cytoplasmamembran.
Vergrößerung: 2 990 x

33

Abb. 34: Gut gefriersubstituierte Zygote im Negativkontrast

Präparation: KS in Methanol / GA 3% / UAc 0,5% / OS 1%
KS-Dauer ein Tag

Vergrößerung: 16 800 x

Beachte den glatten Verlauf der Plastidenmembranen, der ein einwandfreies Einfrieren anzeigt!

Die zu geringfügigen Kontrastunterschiede im übrigen Cytoplasma machen aber das Erkennen anderer Organelle beinahe unmöglich. N = Zellkern;

Abb. 35: Die Heterogenität einer Häutchenpopulation zeigt sich auch nach der Kryopräparation

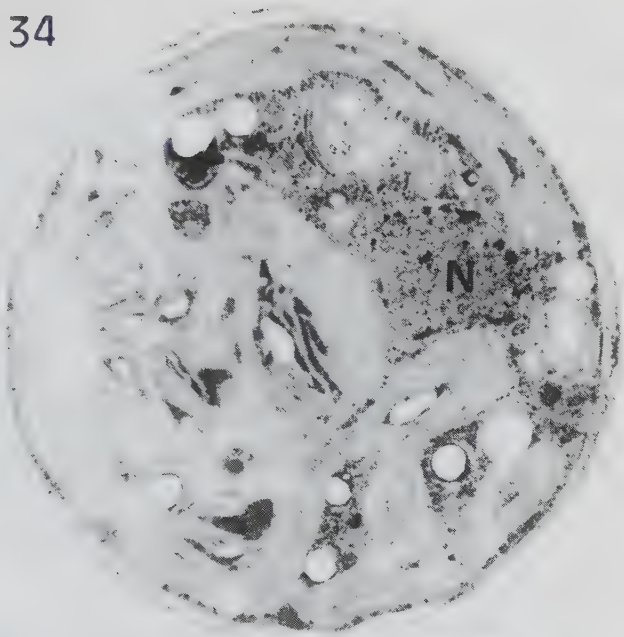
Präparation: KS in Aceton / OS 4%
KS-Dauer drei Tage

Vergrößerung: 6 270 x

Die drei in einem Häutchen anzutreffenden Zelltypen liegen hier nebeneinander. Man erkennt von links nach rechts:

Typ I: Platten-Typ (nicht auswertbar)
Typ II: dunkler Zygotentyp (nur schwer auswertbar)
Typ III: heller Zygotentyp (problemlos auswertbar)

34



35

Abb. 36 - 39 stellen vier hervorragend gefriersubstituierte Zygoten vor

---

Präparation: Aceton / OS 4% drei Tage lang

Beachte das unterschiedliche Erscheinungsbild der Zygotenwand, die feinen Risse in der äußeren Wandschicht (Pfeile) und die glatten Konturen aller Organelle!

Abb. 36: Dieser Schnitt ist nicht nachkontrastiert!

Stärkegranula (S) und extrahierte Lipidkörper (L) bilden einen fast störend deutlichen Kontrast zum dichten Cytoplasma.

Der Zellkern ist in dieser Zygote exzentrisch lokalisiert (N).

Die überwiegend sehr kompakte Matrix der Mitochondrien (*) dieser Zygote erschwert das Erkennen der Cristae. Vergrößerung: 13 080 x

Abb. 37: Medianschnitt durch Zygote D
Die langgestreckten Mitochondrienanschnitte links oben gehören zu einem Organell, welches die Plastide durchbricht.

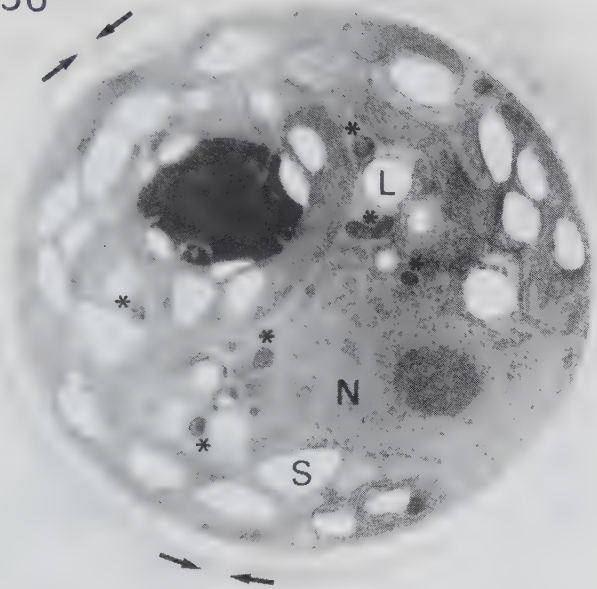
Stellenweise wird der geordnete Verlauf der Thylakoidmembranen durch ungleich große hellere Zwischenräume gestört (*), die vermutlich von minimalen Einfrierschäden herrühren.

Beachte die Nähe der meisten Mitochondrienprofile zum Zellkern (N).

S = Stärkegranula
L = extrahierte Lipdkörper

Vergrößerung: 16 740 x

36



37

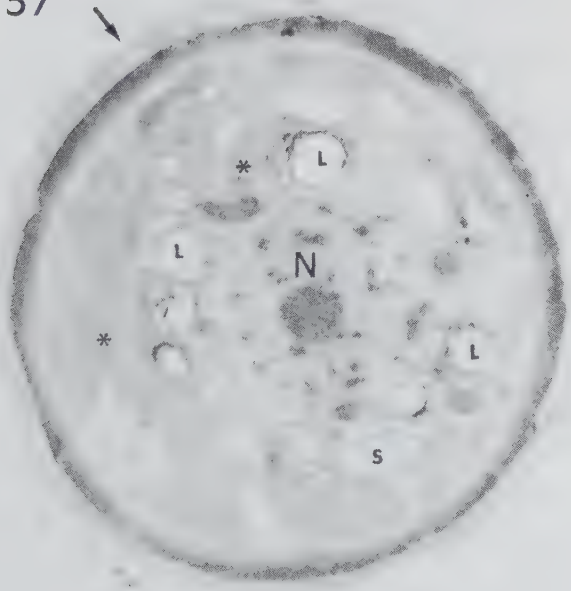


Abb. 38: Tangentialschnitt durch eine Zygote

Das langgestreckte Mitochondrium (M) ist in enger Nachbarschaft zum Zellkern lokalisiert.

Diese Abbildung zeigt deutlich, wie schwierig sich das Erkennen der äußeren Kernanschnitte wegen des schlechten Kontrastes der Kernhülle gestaltet.

Vergrößerung: 18 910 x

Abb. 39: Medianschnitt durch Zygote C

Beachte auch hier die stellenweise leicht ungeordnet verlaufenden Thylakoidmembranen (*).

Die klare Wiedergabe der Mitochondrienprofile in Übergangsstadien zwischen Kontinuität und Diskontinuität (M) spricht für die Qualität der Präparation.

G = Golgi-Apparat
S = Reservestärke
L = Extrahierter Lipidkörper

Vergrößerung: 15 500 x

38

39

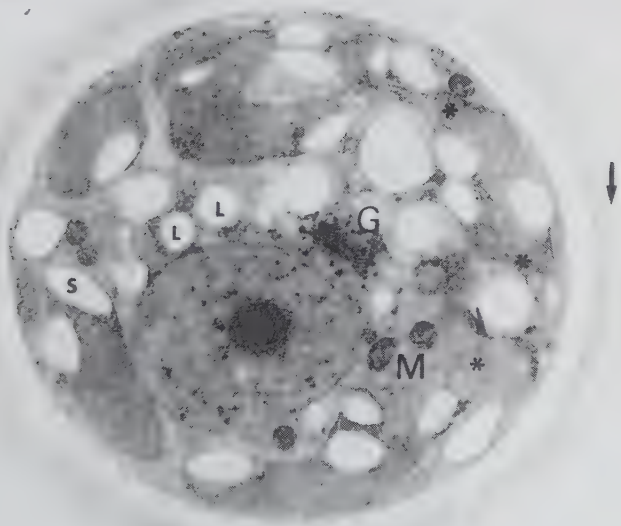


Abb. 40: Detailaufnahme aus einer Zygotenwand

Man erkennt von außen nach innen folgende Zygotenwandschichten:

- # fibrilläre Schicht (FL) mit Riß
- # Zwischenschichten (Pfeil)
- # dunkle homogene Schicht
- # innere homogene Schicht (*)

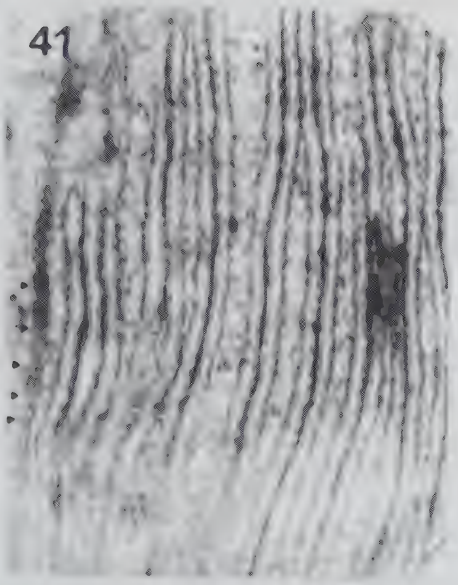
Der Riß endet an den Zwischenschichten.

Vergrößerung: 30 070 x

Abb. 41: Detailaufnahme aus einem Plastidenbereich

Die Thylakoidmembranen sind wie eine Parallelenschar im Plastidenstroma angeordnet. Die Gefriersubstitution stellt die periodische Anordnung dieser Membranen eindeutig dar.
Beachte das enge Aneinanderliegen von äußerer und innerer Hüllmembran (Pfeilspitzen)!

Vergrößerung: 166 400 x


41

40
FL

Abb. 42: Medianschnitte durch fünf verschiedene Zygotenkerne

Zu beachten ist der geringe Kontrast der Kernmembran. Dank der Anhäufung von Ribosomen entlang der Kernoberfläche ist der Verlauf der Kernhülle aber doch noch zufriedenstellend zu erkennen.

In den Nukleoli ist das Vorkommen von "Pars fibrosa" (PF) und "Pars granulosa" (PG) vereinzelt sehr gut zu erkennen.

Das Karyoplasma der Kerne a,b,c und e enthält wenig kondensiertes Material.

Abb. 42a: Kern von Zygote A
Vergrößerung: 26 660 x

Abb. 42b: Kern von Zygote B
Beachte das Kernkörperchen (Pfeil)!
Vergrößerung: 24 800 x

Abb. 42c: Kern von Zygote C
Vergrößerung: 25 420 x

Abb. 42d: Kern von Zygote D
Im Gegensatz zu den übrigen Kernen zeigt der Kern dieser Zelle deutlich mehr kondensiertes Material im Karyoplasma. Es besteht möglicherweise aus Heterochromatin.
Vergrößerung: 30 560 x

Abb. 42e: Kern von Zygote E
Vergrößerung: 30 560 x

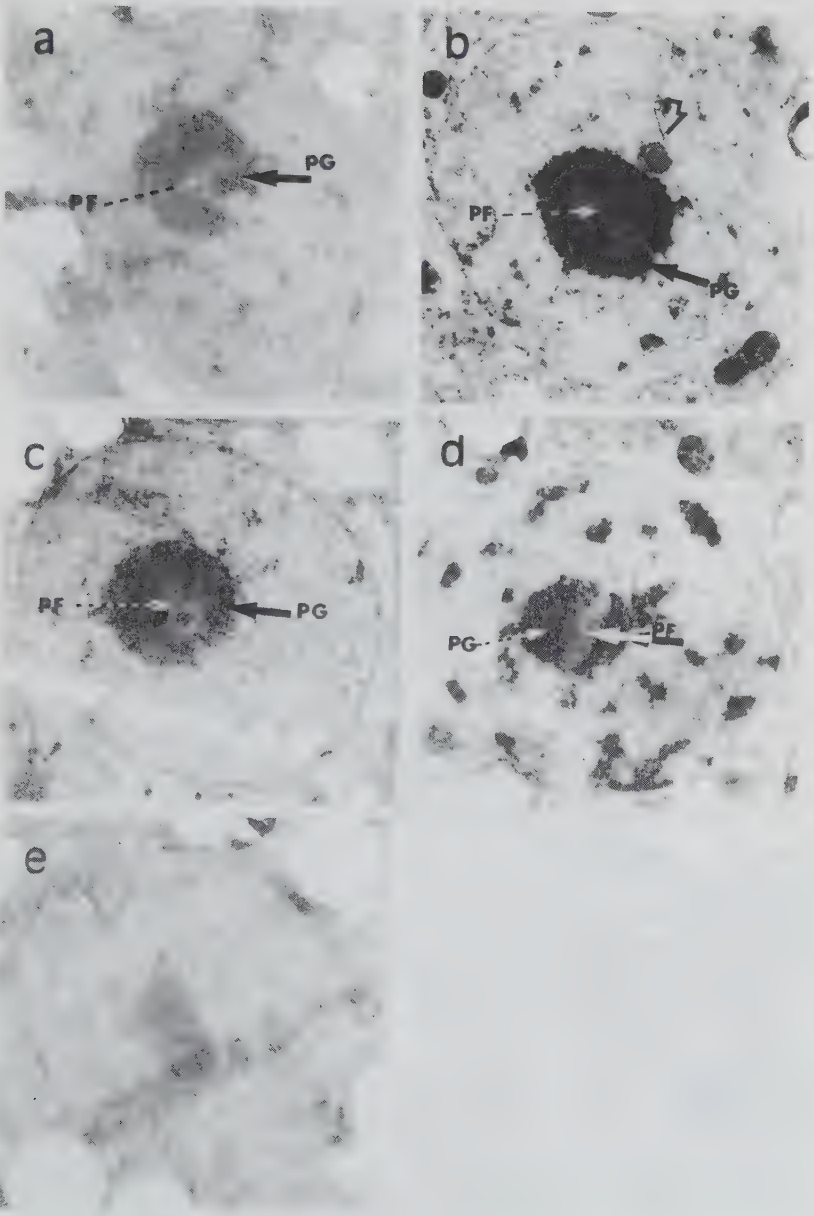

a
PG
PF
b
PF
PG
c
PF
PG
d
PG
PF
e

Abb. 43: Kernkörperchen in der Zygote

Von fünf eingehend untersuchten Zygotenkernen enthielten zwei je ein Kernkörperchen.

Abb. 43a: Zygote B
Kernkörperchen (KK) liegt in unmittelbarer Nähe zum Nukleolus. Dieser ist im Kontaktbereich eingekerbt.
Vergrößerung: 21 700 x

Abb. 43b: Zygote C
Kernkörperchen (KK) liegt in der Kernperipherie unweit der Kernhülle.
Vergrößerung: 25 730 x

Abb. 44: Die Lipidkörper in der Zygote

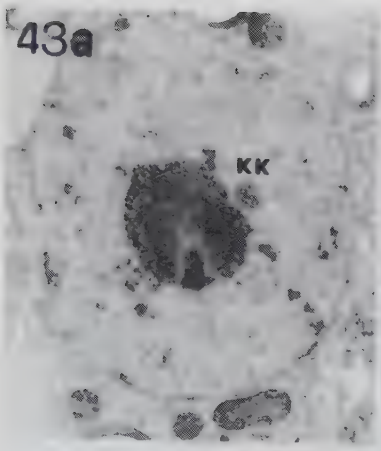
Fast alle Zygotenanschnitte sind gekennzeichnet durch Kavitäten, die einen beinahe störenden Kontrast zum Cytoplasma bilden. Diese drei Ausschnittsbilder von verschiedenen Zygoten zeigen, daß diese Kavitäten Extraktionsartefakte darstellen:

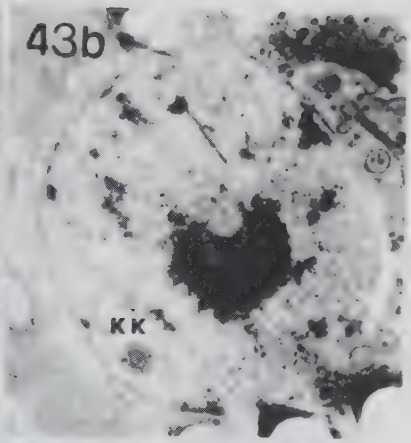
Es handelt sich um Lipidkörper (L), von denen einige zum Teil noch ihren inhomogenen Inhalt vorzeigen (Pfeil), da sie nur unvollständig extrahiert wurden.

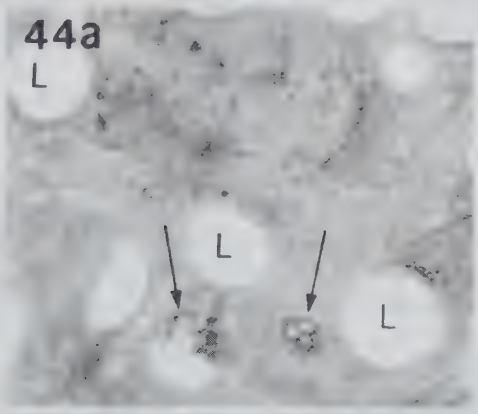
Abb. 44a: Vergrößerung: 34 720 x

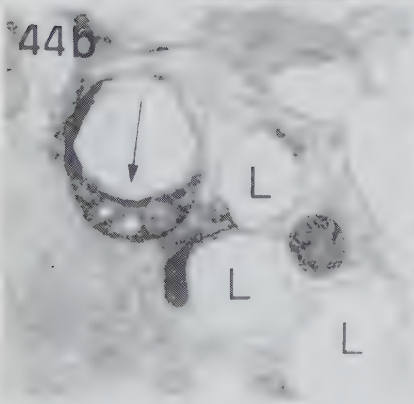
Abb. 44b: Vergrößerung: 34 720 x

Abb. 44c: Vergrößerung: 26 350 x


43a
KK


43b
KK


44a
L
L
L


44b
L
L
L

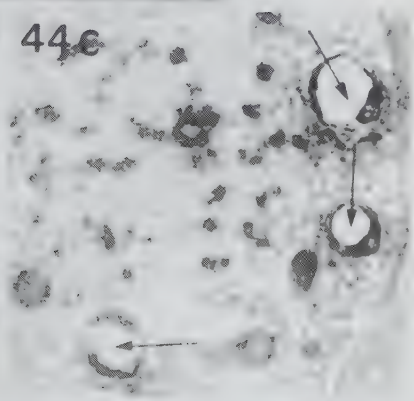

44c

Abb. 45 - 47: Die Strukturerhaltung der Mitochondrien nach Gefriersubstitution

Abb. 45: Drei Beispiele, die den für morphometrisches Auswerten bestens geeigneten Strukturerhaltungszustand der Mitochondrien dokumentieren. Die kompakte Matrix und die glatten Organellenkonturen erlauben ein sicheres Erfassen der Profile auch in Grenzsituationen (Abb.45a,b).

Abb. 45a: Es besteht keine Kontinuität zwischen den beiden Anschnitten.
Vergrößerung: 76 670 x

Abb. 45b: Es besteht eben noch Kontinuität zwischen den beiden Organellenteilen.
Vergrößerung: 64 000 x

Abb. 45c: Vergrößerung: 74 620 x

Abb. 46: Die Darstellung der Hülle gefriersubstituierter Mitochondrien

Abb. 46a: Nur noch vereinzelt ist die äußere Mitochondrienmembran an Stellen mit pentalaminarer Membranstruktur erhalten (Karrée). Ansonsten läßt der feinkörnige Belag entlang der Organellenoberfläche eine präparationsbedingte Reduzierung der äußeren Mitochondrienmembran vermuten (Pfeilspitzen).

Beachte auch den gleichmäßigen fast parallelen Verlauf der Cristae-Membranen!

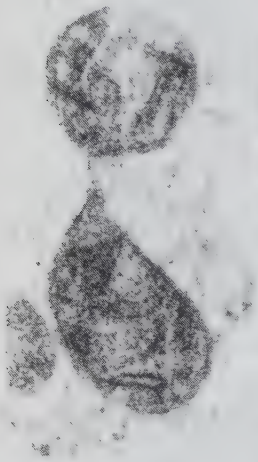
Vergrößerung: 204 800 x

Abb. 46b: Man erkennt ebenfalls eine beinahe freiliegende Cristae-Einstülpung (Pfeil).

Auch hier zeigt die Mitochondrienhülle an Stellen erhalten gebliebener äußerer Membran abschnittsweise einen pentalaminaren Aufbau (Pfeilspitzen).

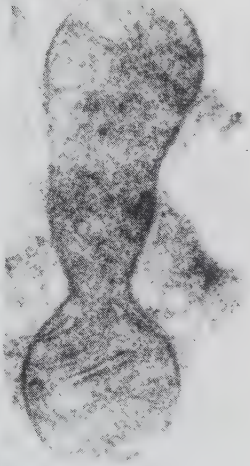
Vergrößerung: 155 550 x

45a

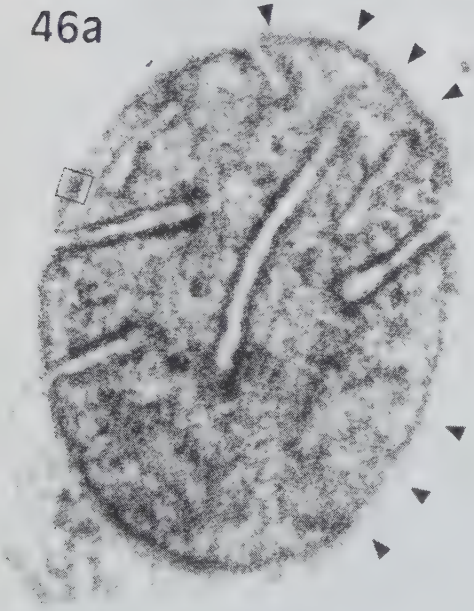


45b

45c



46a



46b

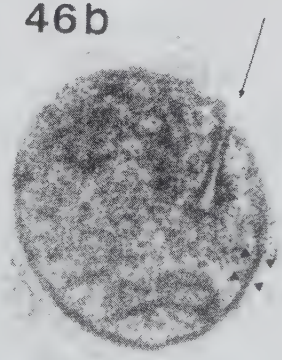


Abb. 47: Die Hülle und die Cristae gefriersubstituierter Mitochondrien

Die meisten Mitochondrien der gefriersubstituierten Zygoten verfügen über eine markante Hülle, die aus der eng aneinandergepreßten äußeren und inneren Mitochondrienmembran besteht. Nur vereinzelt gelingt es, das fünfschichtige Membranmuster aufzulösen (Pfeilspitzen).

Abb.47a: Vergrößerung: 156 800 x

Abb.47b: Beachte neben der Mitochondrienhülle auch die engen Cristae!
Vergrößerung: 160 650 x

Abb.47c: Beachte die unterschiedliche Weite verschiedener Cristae! Manche Cristae scheinen ganz geschlossen zu sein.
Vergrößerung: 206 550 x

Abb.47d: Die in der Peripherie geschlossenen Cristae weiten sich zur Organellenmitte hin auf.
* scheibenförmige Cristae in Aufsicht
Vergrößerung: 141 450 x

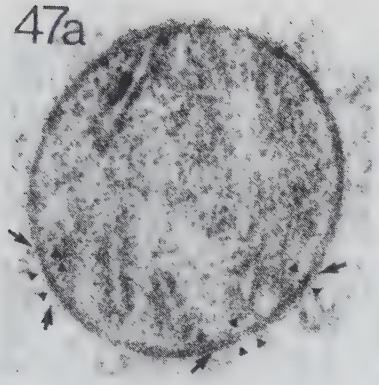
Abb. 48: Drei Beispiele für degenerierende Mitochondrien in der reifen Zygote

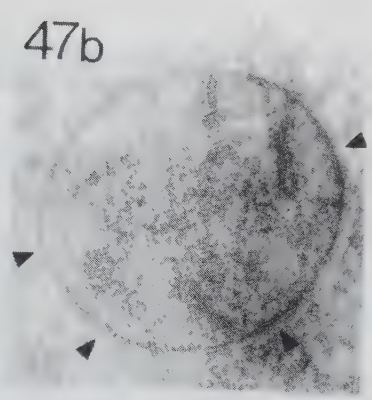
Diese Mitochondrienformen werden nur in der Zygotenperipherie angetroffen.

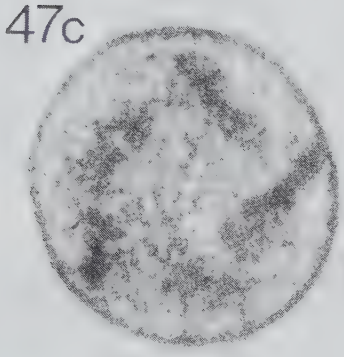
Abb. 48a: PM = Plasmamembran
ZW = Zellwand
Vergrößerung: 112 200 x

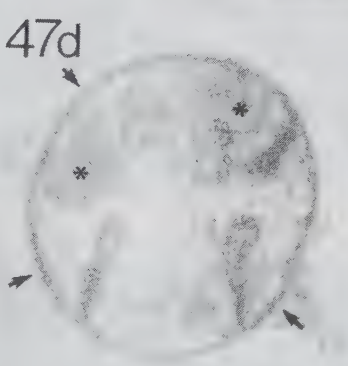
Abb. 48b: Man erkennt ein "gesundes" und ein degenerierendes Mitochondrium.
ZW = Zellwand
Vergrößerung: 27 940 x

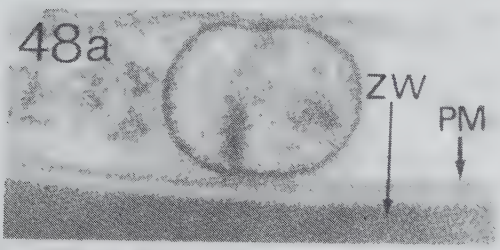
Abb. 48c: Dieses Bild zeigt zwei degenerierende neben einem "gesunden" Mitochondrium.
Vergrößerung: 45 760 x

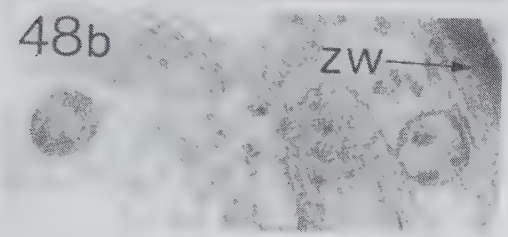

47a


47b


47c


47d


48a
ZW
PM


48b
ZW

48c

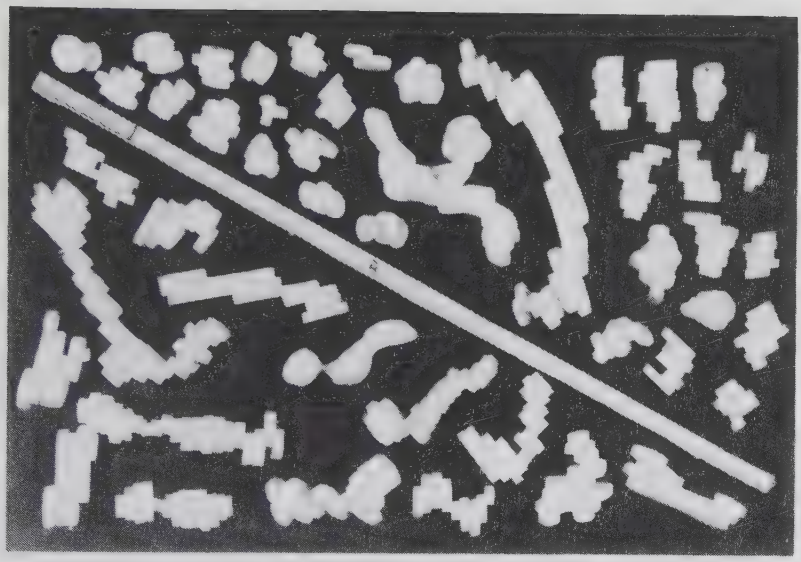
Abb. 49 und 50: Modelle der Mitochondrieninventare der Zygoten A und B

Der jeweils diagonal gelegte weiße Stab unterteilt die Populationen in ihre Gestaltskategorien. Die Stablänge entspricht dem größten Zygotendurchmesser, der schraffierte Bereich des Stabes stellt 1 µm dar.

Abb. 49: Das Chondriom der Zygote A mit 46 Mitochondrien:
Unterhalb des Stabes sind die langgestreckten unverzweigten Individuen plaziert (Kategorie "l").
Oberhalb des Stabes in der Mitte erkennt man die zwei verzweigten Mitochondrien (Kategorie "v"). Links davon erkennt man die kleinen rundlichen (Kategorie "k"), rechts davon die kleinen länglichen Organelle (Kategorie "fk").

Abb. 50: Die 75 Mitochondrien der Zygote B im Modell:
Rechts vom Stab: Kleinere Mitochondrien ("fk" oben, "k" unten.
Links vom Stab: Größere/Große Individuen.
In die oberste Reihe wurden die verzweigten Organelle plaziert, darunter sind die langgestreckten unverzweigten Mitochondrien zu beobachten.
Das mit (*) markierte Gebilde besteht aus zwei nur wenig voneinander separierten Individuen und kann in Abb.53a in Aufsicht beobachtet werden.

49



50

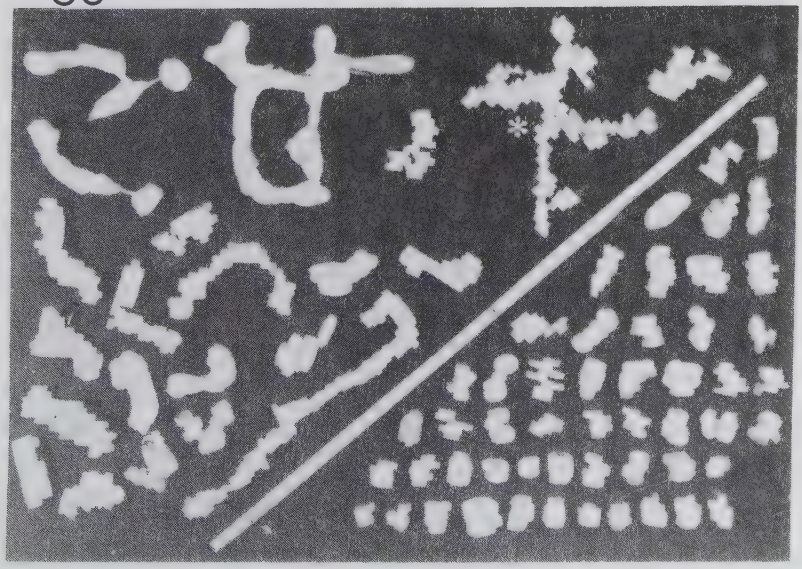


Abb. 51: Die Mitochondrien der Zygote D

Von den 11 ausgemessenen Organellen dieser Zelle wurden die vier größten maßstabsgetreu vergrößert.

Gezeigt ist teilweise auch die tatsächliche Organellenlänge!

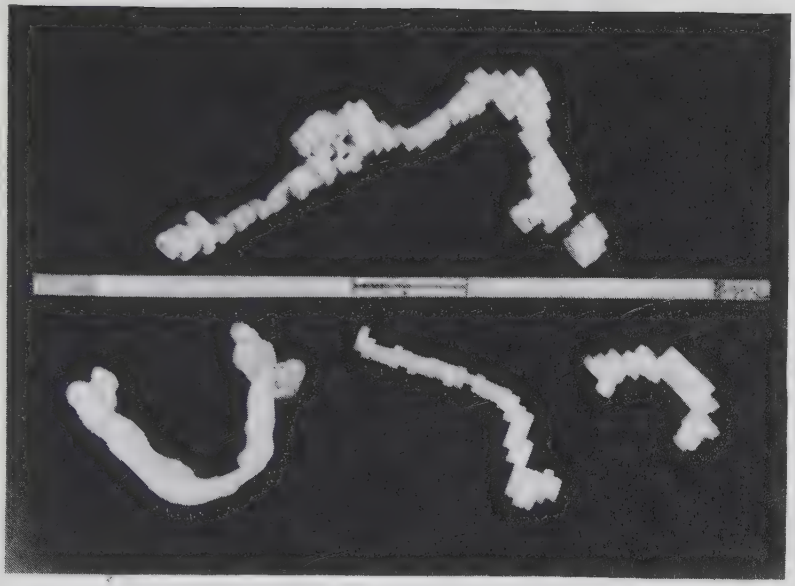
Stablänge = Zygotendurchmesser
schraffierte Stabenden = Dicke der Zygotenwand
Teilstrich in Stabmitte = 1 µm

Abb. 52: Drei einige Beispiele für Mitochondrien mit Einschnürungsstellen

Im Modell konnten von den Einschnürungsstellen (Pfeile) aus Stabilitätsgründen nicht alle maßstabsgetreu wiedergegeben werden.

Das Mitochondrium links besitzt eine Gesamtlänge von etwa 5,2 µm.

51



52

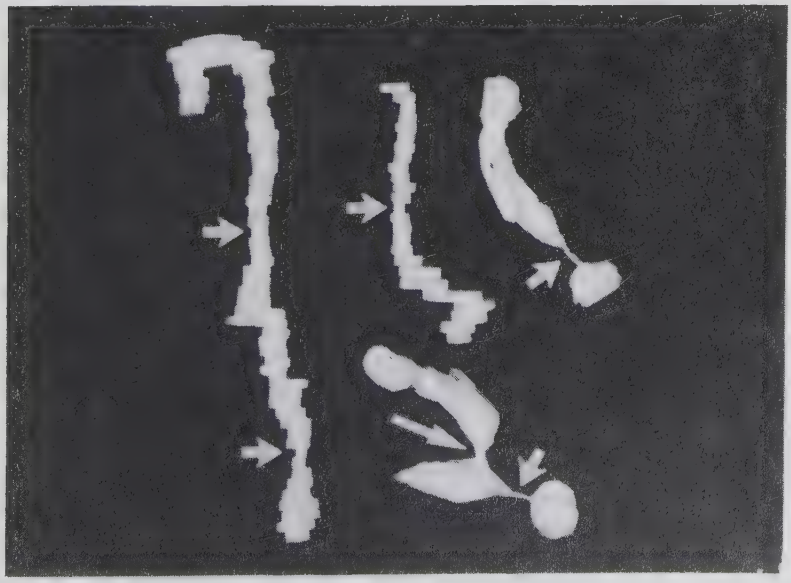


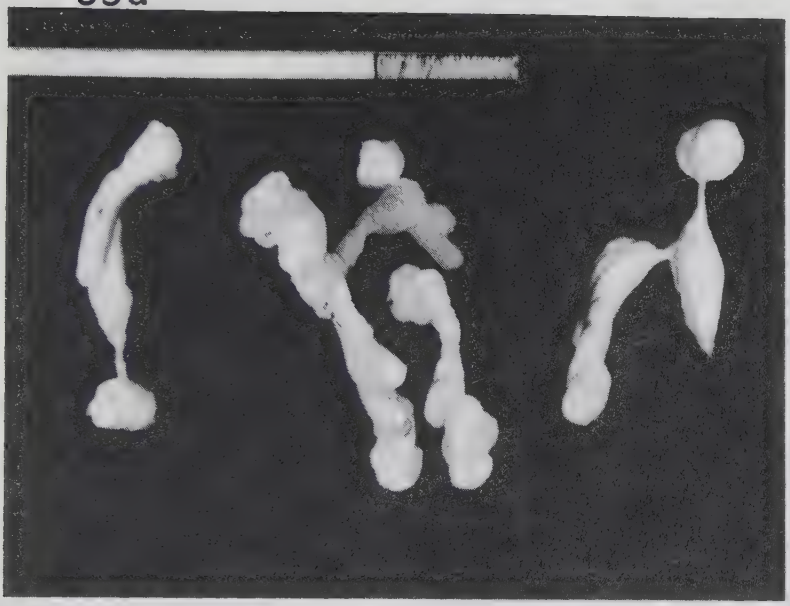
Abb. 53 zeigt im Modell zwei Beispiele für Mitochondrien, die in sehr geringem Abstand zueinander separiert sind

Die mit abgebildeten eingeschnürten Individuen lassen erkennen, daß die Länge ihres dünnen Verbindungssteges in etwa der Distanz zwischen den beiden separierten Mitochondrien entspricht.

Abb. 53a: Man sieht in der Mitte zwei langgestreckte und leicht verzweigte Mitochondrien in enger Nachbarschaft zueinander, die aus anderer Perspektive auch in Abb. 50 beobachtet werden können. Der Trennungsabstand beträgt etwa 0,2 - 0,3 µm.
Schraffierter Teil des Stabes = 1 µm;

Abb. 53b: Ein sehr kleines Mitochondrium ist in sehr geringem Abstand zu einem langgestreckten, teilweise verzweigten Organell in der Zelle anzutreffen.
Vergrößerung wie Abb. 53a;

53a



53b

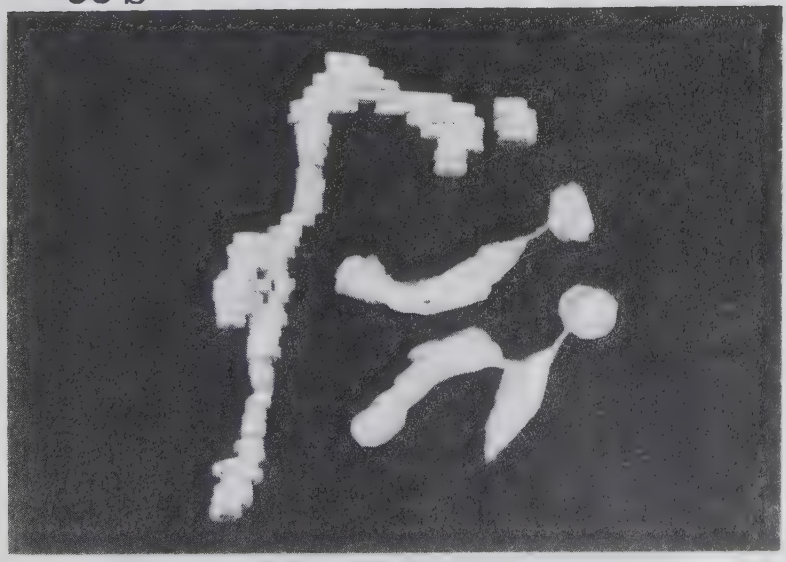


Abb. 54 und 55: Mitochondrien in enger Assoziation zum Kern

Aufgrund des schlechten Membrankontrastes ist der Verlauf der Kernhülle durch Pfeile markiert.
Es ist wahrscheinlich, daß sich Kern und Mitochondrium berühren.

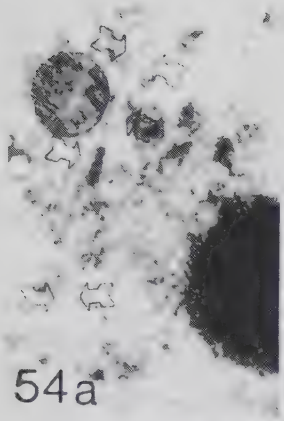
Abb. 54: Drei aufeinanderfolgende Schnitte durch Zygote A; rechts unten ist der Nukleolus eben noch sichtbar.
Vergrößerung: 55 120 x

Abb. 55: Vier aufeinanderfolgende Schnitte durch Zygote D; rechts oben erkennt man Chromatin, welches an der Innenseite der Kernhülle anliegt.
Vergrößerung: 83 840 x

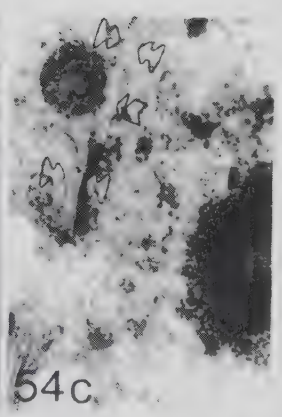
Abb. 56: Das ringförmige Mitochondrium aus Zygote B

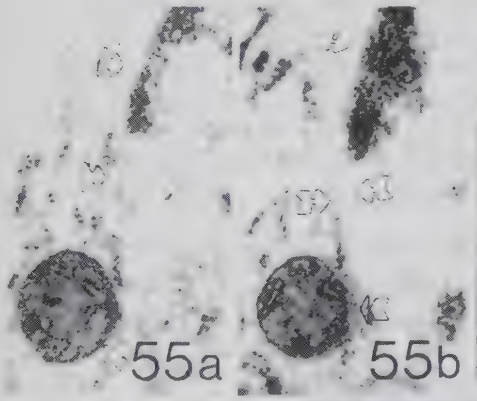
Dieses Organell ist auch dargestellt in Skizze 7 (Seite 66).
Die ersten Tangentialschnitte durch den Zellkern schmiegen sich in den Hohlraum innerhalb dieses Ringes (*).

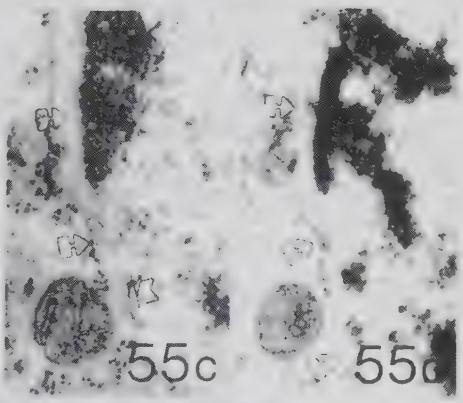
Schraffierter Teil des Stabes = 1 µm;

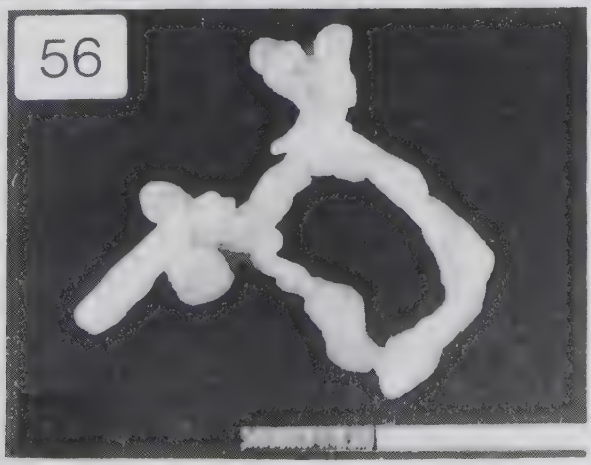

54a

54b


54c


55a 55b


55c 55d


56

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof.Dr. C.G. Arnold für die Motivation zu diesem Vorhaben und dessen wohlwollende Unterstützung in allen seinen Phasen sowie die ständige Disskussionsbereitschaft, Herrn Dr. K.P. Gaffal für die Anregung zur Kryopräparation und die bereitwillige kritische Auseinandersetzung mit dem Arbeitsfortgang und Herrn Dr. M. Müller (Zürich) für die große Hilfsbereitschaft bei der Einarbeitung in die Technik der Gefriersubstitution. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau G.J. Friedrichs für die stets gewährte Hilfestellung in Fragen der Elektronenmikroskopie und der Fototechnik und für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken möchte ich mich für das freundliche Arbeitsklima.

Lebenslauf

31.12.1956	Geboren in Bamberg als Sohn des Postbeamten Konrad Brand und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Schatz
1963 - 1967	Besuch der Volksschule Wunderburg, Bamberg
1967 - 1976	Besuch des Franz-Ludwig-Gymnasiums, Bamberg
Juni 1976	Abitur
1976 - 1977	Wehrdienst
Nov. 1977 - - Mai 1981	Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg
1981 - 1982	Pharmaziepraktikant in der Spital-Apotheke, Nürnberg und bei der Bayer AG, Leverkusen
Aug. 1982	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg und Beginn einer Dissertationsarbeit
Okt. 1982	Approbation als Apotheker
Nov. 1983	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg
seit Aug. 1986	DFG-Mitarbeiter

Offsetdruck · Fotodruck · Hogl · Hauptstraße 109 · 8520 Erlangen · Tel.09131/22990